N/A

Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

PL4228

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

I. N. R. A.
SERVICE DE DOCUMENTATION
25. OCT. 1982
UNITE CENTRALE DE VERSAILLES

10
1981

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

LB-11

C.R.Ann. Trav. Lab. Biochimie - Vol. 10, 1981 -

S O M M A I R E

INTRODUCTION..... 1-2

Première Partie : COMPTE RENDU SCIENTIFIQUE -

Chap. I -BIOCHIMIE ANALYTIQUE

I-1 - Micro-Analyse quantitative par C.C.M. ... III-Les Lipides.... 5-6

I-2 à I-4 - Ouvrages en préparation..... 7

Chap. II -L'INDUCTION DES α-GLUCOSIDASES D'ABEILLES

II-1 - Adaptation de l'activité des Tréhalases aux variations de la tréhalosémie : un mécanisme apparent de type inductif..... 8-9

II-2 - Adaptation des Saccharases et tréhalases aux variations de glycémie provoquées par le saccharose per os..... 10-18

II-3 - Adaptation des pNP- α-D-glucosidases aux variations de la glycémie..... 19-25

Chap. III -ANOMALISTIQUE SPATIALE..... 26

Chap. IV -CONTROLE HORMONAL DE LA GLYCEMIE DE L'ABEILLE

Introduction

IV-1 - Action de l'injection de sérum physiologique..... 27-30

IV-2 - Les Diglycérides de l'Hémolymphe d'Abeille..... 31-34

IV-3 - Influence du jeûne sur la glycémie et la lipémie..... 35-36

IV-4 - Action de l'insuline endogène sur la glycémie et la lipémie 37-38

IV-5 - Influence de l'octopamine sur la glycémie et la lipémie..... 39-41

IV-6 - Action de l'AMP cyclique sur la glycémie et la lipémie..... 42-43

IV-7 - Action d'un β-bloquant : le propranolol sur les effets hormonaux endogènes ainsi que sur ceux de la noradrénaline, de l'octopamine et du glucagon..... 44-48

IV-8 - Action de l'Adrénochrome..... 49-51

IV-9 - Mécanismes d'action de la Somatostatine chez l'Abeille

A- Action des formes linéaire et cyclique sur les effets hormonaux endogènes..... 53-56

B- Neutralisation des effets de l'insuline bovine..... 57-58

C- Neutralisation des effets de l'insuline endogène..... 57-60
D- Action sur les effets du glucaton de porc..... 61
E- Action sur les effets adrénergiques..... 62-64
F- Etude de l'interaction somatostatine/AMP cyclique..... 65

Chap. V -INTERACTION β BLOQUANT/PEPTIDERGIQUE..... 66-67

Chap. VI -PATHOLOGIE BIOCHIMIQUE..... 68-69

Chap. VII -ETUDE SUR LES α-GLUCOSIDASES D'ABEILLES, DU MECANISME D'ACTION D'INHIBITEURS THERAPEUTIQUES DESTINES A LA LUTTE CONTRE LES DIABETES..... 70-77

Chap. VIII -BIOCHIMIE APPLIQUEE A LA PHYTO PROTECTION..... 78

Deuxième Partie : COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

Chap. I -BILANS BUDGETAIRES
I-1 - Fonctionnement..... 83
I-2 - Equipement..... 84

Chap. II -PREVISIONS 1982..... 84

Chap. III -ATTRIBUTIONS DE PERSONNEL..... 88

Troisième Partie : BIBLIOGRAPHIE 1981

13 titres parus et sous presse..... 91-93

CONCLUSION GENERALE..... 95

I N T R O D U C T I O N

Au cours de 1981, le Laboratoire de Biochimie (LBC) a essentiellement poursuivi les programmes de recherches engagés depuis plusieurs années sur les hormones du contrôle de la glycémie (avec un important développement de l'étude de la somatostatine), et parachevé l'étude des mécanismes d'induction ainsi que de certaines applications thérapeutiques des propriétés des α-glucosidases d'Abeilles. Sur le plan des techniques, après la publication du 3ème volet, "les lipides", dans Analusis, un contrat a été signé avec les Editions Masson en ce qui concerne l'ouvrage : "l'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince". Une clause réserve le droit d'édition d'une future version en anglais considérée comme très attendue (*) par Acad. Press (New York).

Un travail complet de Biochimie Végétale a été effectué en cours d'année, d'une part en relation avec le CNES (GEPAN : anomalistique spatiale) et d'autre part avec le Centre Universitaire d'Avignon : Phytoprotection. Cet aspect de "sémiologie biochimique végétale" constitue, au même titre que les travaux effectués sur les récepteurs hormonaux du contrôle du métabolisme de l'Abeille, ainsi que ceux de 1980 sur la dynamique biochimique de l'agonie et de la mort des larves (thanatochimie) une préparation très concrète aux futurs programmes d'applications toxicologiques inscrits dans le cadre du département de Phytopharmacie.

A ce sujet, précisément, le transfert du LBC au département de Phytopharmacie, décidé depuis Décembre 1980, sera officiel à partir du 1er Janvier 1982. L'année "administrative" 1981 ne s'est donc caractérisée que par la rémanence d'une situation hybride dont les conséquences sur la bonne marche du Laboratoire ont été ramenées à leur plus simple expression, selon le bon principe de la primauté absolue des objectifs purement scientifiques.

(*)..."much needed and successful work".

Le LBC a été malheureusement endeuillé par le décès le 31 Juillet de Madame JOLIET, collaboratrice technique et administrative d'une conscience professionnelle et d'une compétence dignes des plus vifs éloges. Hommage continuera à être rendu à sa mémoire dans les nombreuses publications en cours, relatives aux travaux expérimentaux auxquels elle avait participé avec une efficacité constamment accrue...

P R E M I E R E P A R T I E

C O M P T E R E N D U S C I E N T I F I Q U E

I - BIOCHIMIE ANALYTIQUE

I-1 MICRO-ANALYSE QUANTITATIVE PAR C.C.M. DE QUELQUES METABOLITES D'INSECTES - III - LES LIPIDES

M. BOUNIAS - (Analusis, vol 9, 1981 - sous presse)

Les lipides de l'hémolymphe ainsi que de différentes parties du corps d'Insectes sont extraits par le mélange chloroforme-méthanol (80-20) au moyen de micro-homogénéiseurs de type Potter.

Le volume final d'extraits est ajusté à 1 µl par mg de poids frais ou par µl d'hémolymphe et les dépôts sur plaques de gel de Silice (Merck n° 5748) sont de 0,5 à 4 µl.

Un choix d'éluants est proposé pour les acides gras, les mono-, di et tri glycérides, les esters d'acides gras, les phospholipides, les stéroïdes libres et estérifiés. Les alcools gras et les cérides ont été étudiés ultérieurement : le tableau 1 résume les résultats les plus récents.

...

Tableau 1 - Mobilité chromatographique de quelques alcools gras et cérides.

Eluants : 1) Heptane : 18cm

2) Benzène : 15 puis 16cm

3) Trichloréthylène-acétonitrile (85-15) : 7cm

Mobilités (MR) exprimées relativement à celle des esters de Stéroïdes

Alcools "gras"				Cérides		
N°	Nom	Structure	MR	N°	Alcool/Acide	MR
A-1	Penta-décanol	C15	0,310	C1	C12/C16:1	0,88
A-2	Alcool Cétylique	C16	0,315	C2	C18/C18:1	0;93
A-3	Alc. Oléoïque	C18:1	0,323	C3	C18/C20	0,95
A-4	Alc. Béhénylique	C22	0,346	C4	C22/C20	0,96
A-5	Tri-acontanol	C29	0,377			

Autres lipides : Acides gras C18 MR=0,15-0,17

mono glycérides MR=0,08

di glycérides 1-2 MR=0,31-0,33

di glycérides 1-3 MR=0,37-0,39

tri glycérides MR=0,51

esters d'acides gras MR=0,66

stéroïdes libres MR=0,27-0,29

stéroïdes esterifiés MR=1,00

I-2 L'ANALYSE BIOCHIMIQUE QUANTITATIVE PAR NANOCHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Sur supports souples, plaques préfabriquées.

M. BOUNIAS

MASSON Ed., 200 pages - 160 F - Mai 1982 - format 24x16

L'ouvrage est en cours de fabrication sous contrat. La version finale en langue française doit être remise au plus tard le 31 mai 1982.

Les Academic Press (New York) attendent pour les plus brefs délais possibles, la traduction de 3 chapitres de l'ouvrage, en vue de mettre au point leur propre contrat d'édition. Le contenu de la version en langue anglaise sera sensiblement différent de celui de l'édition initiale.

I-3 LA BIOCHIMIE ET L'ABEILLE - (M. BOUNIAS)

Le manuscrit de cet ouvrage dont une première édition est prévue par l'OPIDA, doit être remis au cours du 1er trimestre 1983. La rédaction de la 2ème partie (introduction à la biochimie) est prévue pour septembre 1982, en même temps que le démarrage de l'enseignement de Biochimie fondamentale par l'auteur à la faculté des Sciences d'Avignon (2ème cycle).

I-4 PROBLEMES MATERIELS

Il est absolument indispensable d'acquérir dès janvier 1982 (achat ou location, neuf ou occasion, selon les moyens) une machine de type IBM à boule(*) permettant une mise en page des ouvrages à l'aide de divers types de caractères choisis en accord avec l'Editeur.

(* ou ES 110 avec justification à droite)

C.R.Ann. Trav. Lab. BC - 10, 1981 - Chap.II

II - L'INDUCTION DES α-GLUCOSIDASES D'ABEILLES.

II-1- ADAPTATION DE L'ACTIVITE DES TREHALASES DE L'HEMOLYMPHE D'ABEILLES AUX VARIATIONS DE LA TREHALOSEMIE IN VIVO : UN MECANISME APPARENT DE TYPE INDUCTIF.

M. BOUNIAS et M.R.J. MORGAN (*)

C.R.Acad. Sc. (Paris) Série III, t. 292, p. 1199-1202

(*) Univ. de Lancaster, Dept. Biol. Sci., GB-

Les variations d'activité des tréhalases de l'hémolymphe coïncident avec celles de la tréhalosémie chez des Abeilles recevant du tréhalose *per os*. L'action d'un inhibiteur de la synthèse protéique (chloramphénicol) abaisse l'activité enzymatique et la protéinémie, sans affecter la glycémie. La tréhalase apparaît comme une enzyme adaptative susceptible d'induction par son substrat.

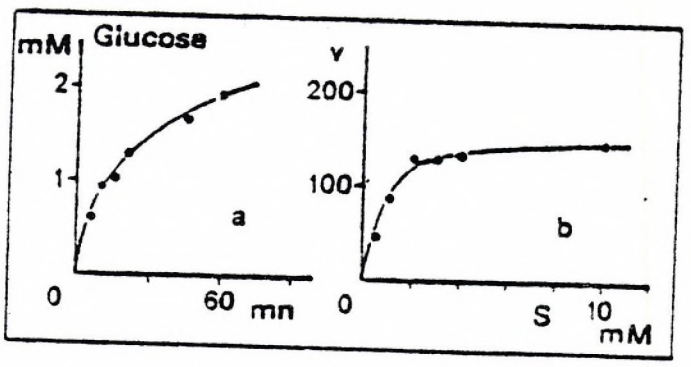


Fig. 1. – Cinétiques d'activité des tréhalases de l'hémolymphe d'Abeilles : (*a*) courbe cinétique d'activité avec 1 mM de tréhalose; (*b*) courbe de saturation (V est exprimée en $\mu M . mn^{-1} . \mu l^{-1}$).

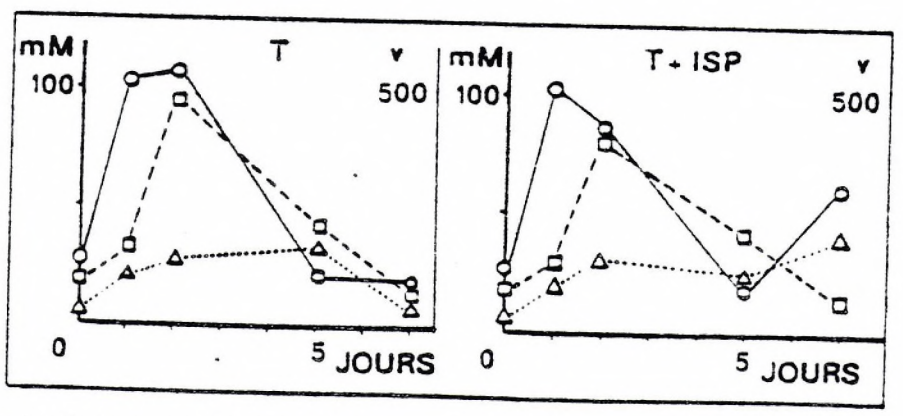


Fig. 2. – Variations de la glycémie (mM) et de l'activité des tréhalases (V : $\mu M . mn^{-1} . \mu l^{-1}$) au cours du temps, dans des échantillons d'Abeilles recevant du tréhalose 1 M pur (T) ou additionné de chloramphénicol (T + ISP). (□ – – – □) : tréhalosémie; (△ . . . △) : glucosémie; (○ ——— ○) : activité des tréhalases.

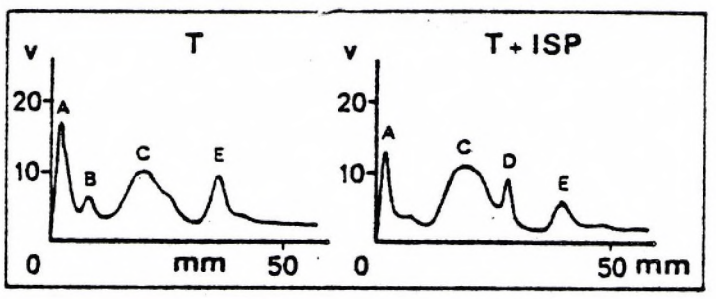


Fig. 3. – Formes moléculaires des tréhalases de l'hémolymphe d'Abeilles séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide. Les échantillons correspondent à 50 µl d'hémolymphe prélevée au temps J + 5. (T) = tréhalose pur; (T + ISP) = tréhalose + chloramphénicol. L'activité est exprimée en $\mu M . mn^{-1} . \mu l^{-1}$.

TABLEAU

Teneur protéïque des fractions tréhalasiques ($\mu g . \mu l^{-1}$) *et activité spécifique des tréhalases* ($\mu M . mn^{-1} . mg^{-1}$) *en relation avec la tréhalosémie* (*mM*) *au cours des traitements nutritifs.*

	Témoins	Tréhalose pur		Tréhalose + Chloramphénicol	
	J	J + 2	J + 5	J + 2	J + 5
Protéinémie (a).	2,35	4,21	1,58	3,66	1,22
Tréhalases (b).	56,60	127,00	71,00	119,30	89,90
Tréhalosémie (c).	16,40	92,20	41,00	85,70	41,70

Incertitudes relatives sur les moyennes pour N = 3 mesures :
(a) ±7,7 %;
(b) ±7,4 %;
(c) ±11,5 %.

II-2 ADAPTATION DES SACCHARASES ET TREHALASES DE L'HEMOLYMPHE D'ABEILLES AUX VARIATIONS DE LA GLYCEMIE PROVOQUEES PAR LE SACCHAROSE ADMINISTRE EN CONTINU PER OS.

M. BOUNIAS et M.R.J. MORGAN
(en préparation pour publication)

Introduction - Les insectes disposent d'un diholoside de réserve dans l'hémolymphe : le tréhalose (α-α diglucoside) dont l'hydrolyse par les α-glucosidases (tréhalases) libère deux molécules de glucose immédiatement disponibles comme source d'énergie.

Les mécanismes enzymatiques de régulation de la glycémie englobent deux processus de sens opposés : la rétro-inhibition des α-glucosidases par le glucose (BOUNIAS, 1975 à 1980) et leur induction par la tréhalosémie (BOUNIAS et MORGAN, 1979 à 1982). Or, les apiculteurs utilisent depuis très longtemps le saccharose comme facteur de nourrissement des colonies d'Abeilles à certaines périodes difficiles (hivernage par exemple). Notre objectif est ici d'une part d'analyser les modalités d'induction d'une activité saccharase par le saccharose, et d'autre part de comparer cette activité à celle des tréhalases afin d'en distinguer les caractères éventuels de spécificité moléculaire.

Méthodes - Les Abeilles naissantes sont placées au jour J. dans des cagettes d'élevage où elles disposent en permanence d'un sirop de saccharose 2M. Parallèlement, des lots reçoivent en supplément du Chloramphémicol (1,6 mM soit une prise quotidienne maximale de 10 n moles par Abeille, ce qui correspond à 0,3 mM dans l'hémolymphe). Cet antibiotique a été récemment décrit comme inhibiteur de la synthèse protéique dans les polysomes de Diptères (FRAGOULI et al., 1978) ainsi que dans les mitochondries (ASHOUR et al., 1978) ce qui s'accorde avec la localisation mitochondriale des tréhalases d'Abeilles (BRANDT et al., 1979). Toutes les autres techniques sont celles décrites précédemment (Cf. II-1).

RESULTATS - Le nourissement par le saccharose fait apparaitre de nouveaux composants glycémiques dont la présence n'avait pas été relevée jusqu'ici dans l'hémolymphe d'Abeilles prélevées soit à partir de la ruche, soit dans les lots nourris sur sirop de tréhalose. Les principaux polyholosides présents ont été identifiés par leurs propriétés chromatographiques avec divers solvants, ainsi que par les caractéristiques de coloration qui différencient le glucose du fructose sur les plaques révélées au Naphtyl-éthylène-diamine-dichlorure et conservées quelques mois au réfrigérateur : le glucose vire alors au gris-vert tandis que le fructose conserve une teinte violette. Les poly-glucosides sont donc gris verts et les fructo-glucosides gris-violacé. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 - Polyholosides de l'hémolymphe d'Abeilles nourries au saccharose (dans l'ordre des mobilités croissantes de P 1 à P 5).

Code	Coloration	Structure probable	Identification
P1	Violet	Glc-Glc-Fru	Gentianose ou erlose
P2	Violet	Glc-Fru-Glc	Mélézitose
P3	Vert	Glc-Glc	Tréhalose
P4	Violet	Glc-Fru	"Saccharoïde"
P5	Violet	Glc (1-2) Fru	Saccharose

- Evolution de la glycémie et des osidases en fonction du temps : les résultats sont illustrés par les fig. 4 et 5

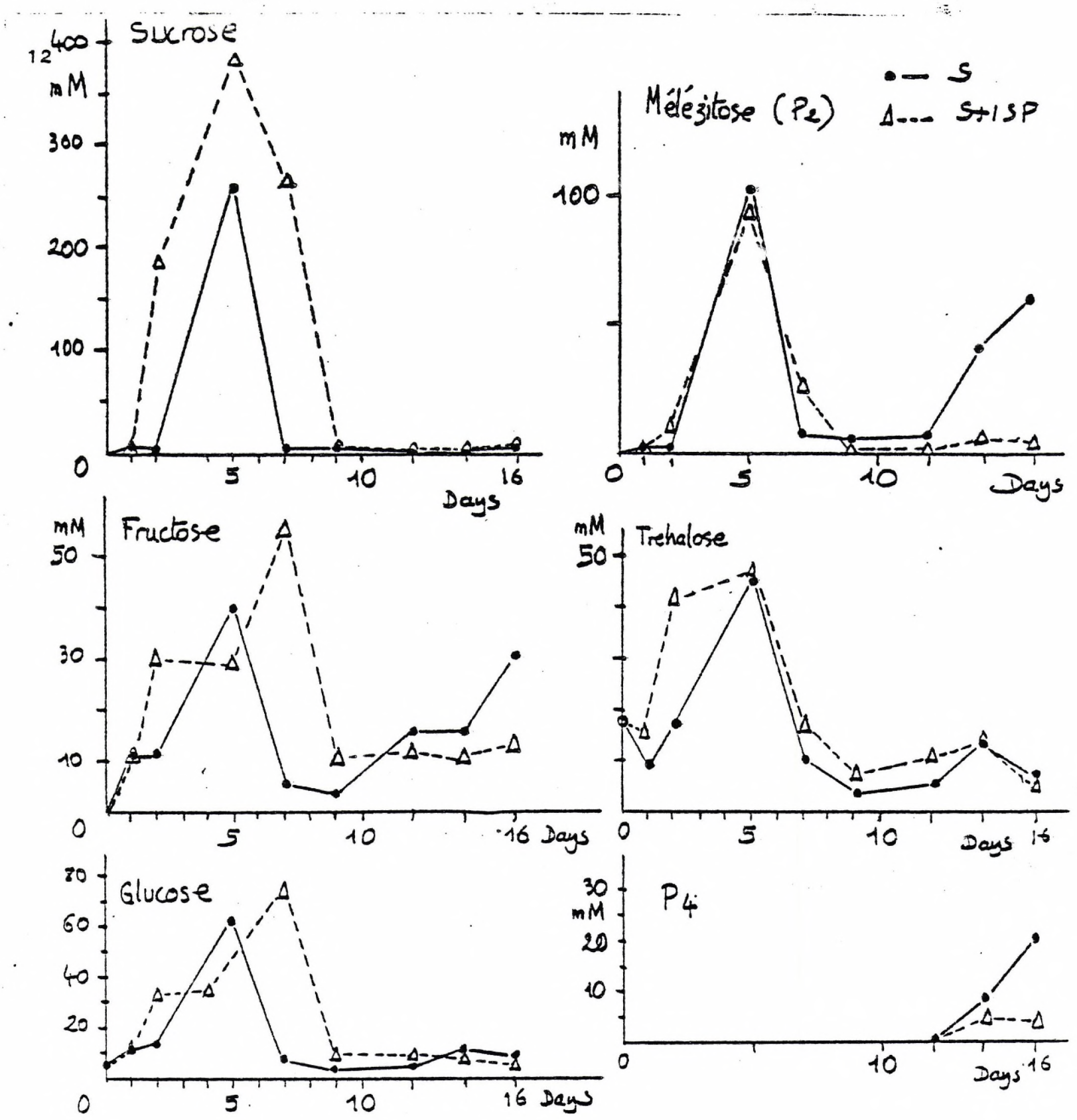
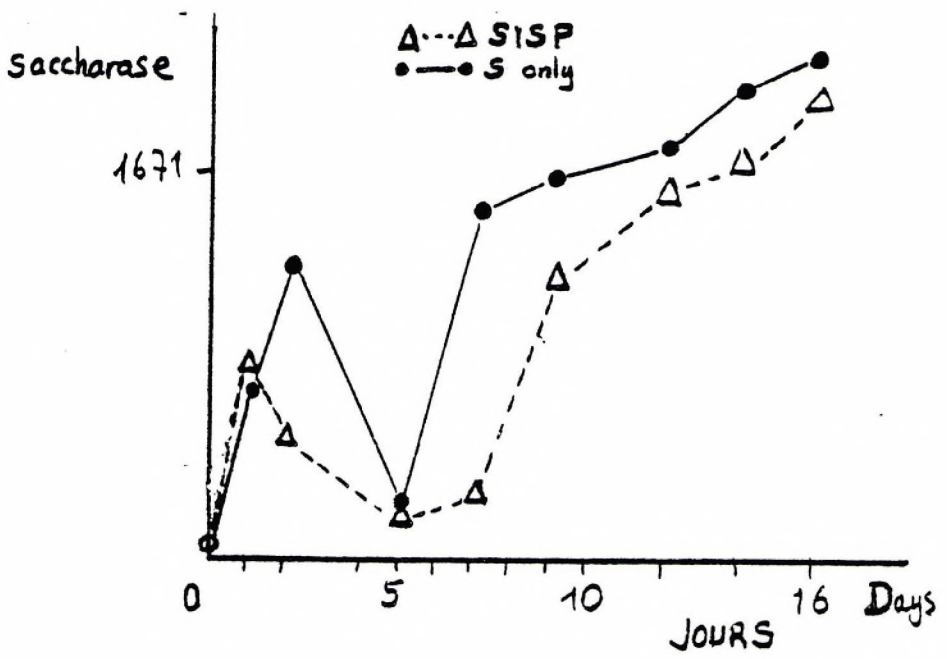


Fig. 4- Variations de concentration des composants glycemiques de l'hémolymphe d'Abeilles recevant "en continu" du saccharose 2M per os. (•—•) saccharose seul (Δ---Δ) Sacch^{ose} + chloramphénicol (ISP)



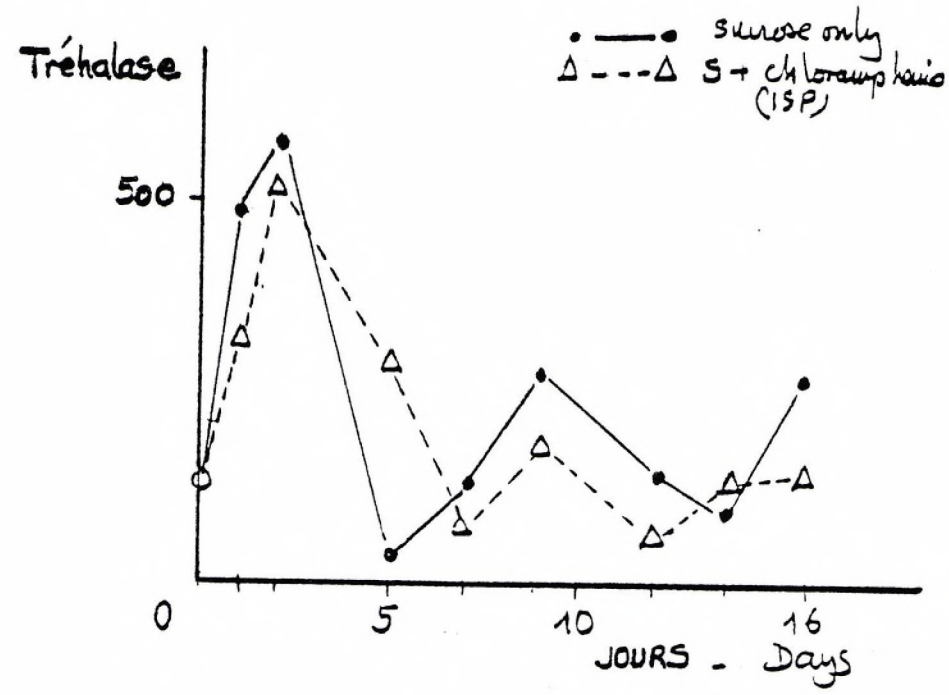


Fig. 5. Variations d'activité des Saccharases et des Tréhalases de l'hémolymphe d'Abeilles recevant du Saccharose 2 M "per os" en continu.

Les saccharases ainsi que les tréhalases augmentent rapidement en même temps que la Saccharosémie (celle-ci reste faible au jour J+1 en raison de l'hydrolyse rapide traduite par l'augmentation conjointe de la fructosémie et de la glucosémie). Il se produit ensuite une chute d'activités osidasiques, à laquelle correspond corrélativement un fort pic de glycémie (en particulier du Saccharose). Par la suite, l'activité des Saccharases augmente de nouveau continuellement et maintient la Saccharosémie à un niveau très bas tandis que celle des tréhalases fluctue autour de la normale et maintient une tréhalosémie relativement basse. Le mélézitose est constitué à partir du glucose et du fructose libérés en excès : il s'accumule temporairement, comme les autres glucides, au temps J+5 puis sa concentration remonte à partir de J+12, comme dans le cas du fructose, ainsi que du dérivé P-4 (isomère du saccharose) qui était absent auparavant.

D'une façon générale, le chloramphémicol abaisse la protéïnémie (BOUNIAS et MORGAN, 1981, Apidologie, 13 n°2, sous presse) et réduit l'activité des enzymes : corrélativement, les Substrats sont plus concentrés, et les produits de la réaction (glucose et fructose) accusent une baisse au temps J+5, qui constitue une phase critique dans la mise en place des processus de régulation.

L'adaptation enzymatique comprend donc deux phases : l'une courte et rapide (J à J+2) suivie d'une seconde plus longue (J+7 à J+16) également très rapide, puisque les Saccharases augmentent de 650% en 2 jours. L'augmentation de Saccharases est peu affectée, dans les premières 24 heures, par l'inhibiteur de synthèse protéïque : il est donc permis d'envisager qu'une phase (la plus "précoce") de l'adaptation enzymatique, soit réalisée par une libération endogène d'enzyme pré-existante à partir d'une structure de type lysosomal, par exemple. L'interruption au temps J+5 pourrait correspondre à un "temps mort" avant le démarrage d'une biosynthèse d'osidases "de novo" par un mécanisme inductif pur.

Les relations entre Saccharase et Saccharose sont relativement simples à mettre en évidence : il s'agit d'une relation inverse de type hyperbolique, traduisant la baisse de Substrat consécutive au travail de l'enzyme (fig.6A). Par contre, si les tréhalases montrent des oscillations opposées à celles de la tréhalosémie, le mécanisme s'avère different, comme l'illustre la fig.6B.

Les courbes observées évoquent de manière frappante l'aspect des "isochrons", interprétations mathématiques de phénomènes oscillatoires chimique et biologique basés sur la fonction de Poincaré (DEMONGEOT et SEYDOUX, 1979, ANEB, GUMOWSKI, 1980) (Cf. Bull. Gr. Et. Rythmes Biol. 13 (3), p. 9-37). Un contact a été pris avec le Dr. DEMONGEOT, de l' Université de Grenoble, en vue de développer de manière concertée cet aspect éventuel de l'interprétation du mécanisme.

FORMES MOLECULAIRES - Les différentes formes moléculaires d'activité saccharase et tréhalase, respectivement, ont été isolées par electrophorèse en gel d'acrylamide et caractérisées par leur activite sur le saccharose (20mM) et le tréhalose (4mM) selon la méthode de MORGAN (Insect Biochem., 1975, 5, p. 251-264).

Les résultats obtenus sont présentés sur la fig. 7. La fraction A est commune aux saccharases et aux tréhalases, tandis que les fractions C et E, de forte activité tréhalasique, sont peu actives sur le saccharose. Ces enzymes correspondent aux classes proteïques A, C1, C2, D, E dont les poids molaires apparents sont indiqués dans le tableau 3.

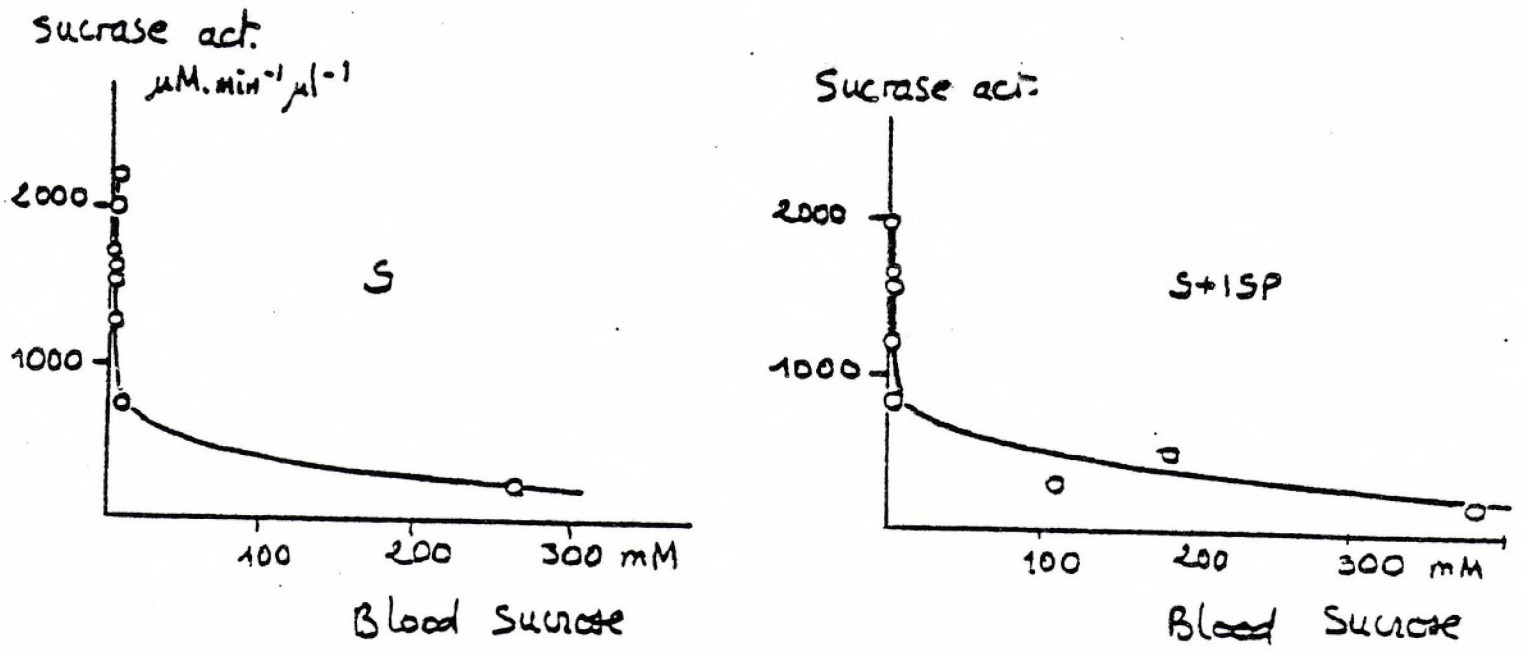
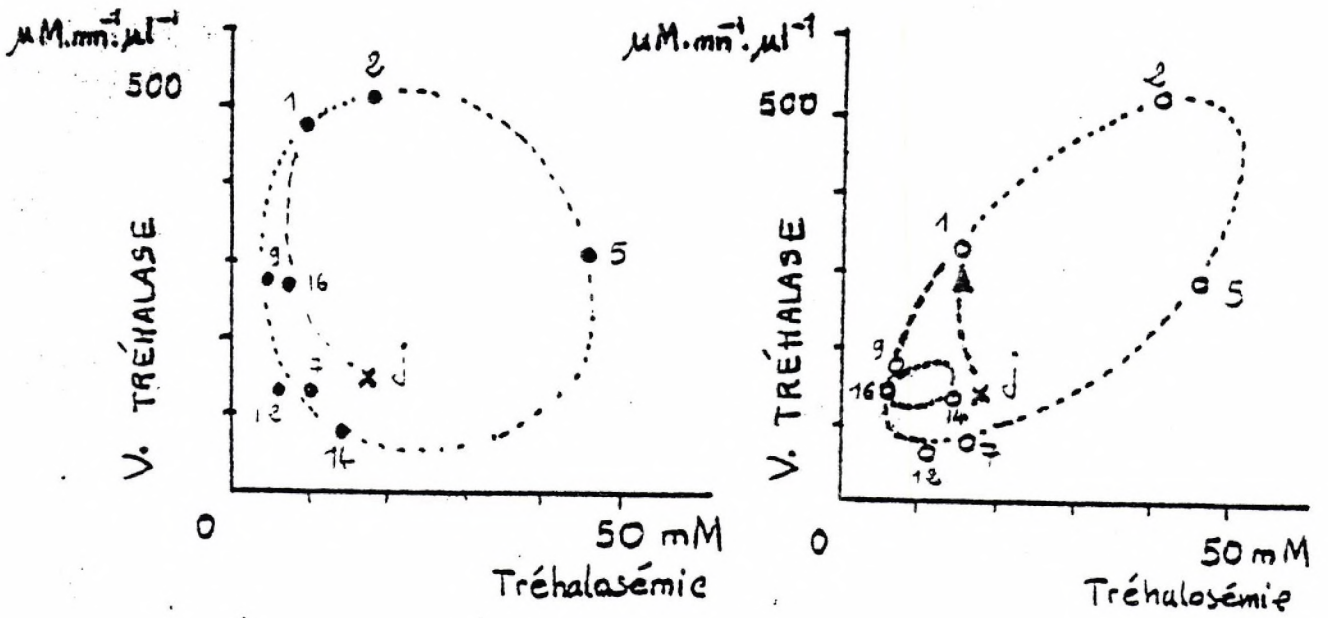


Fig. 6 A- Variations d'activité des saccharases en fonction de la saccharosémie d'Abeilles recevant du Saccharose 2M per os



A - Saccharose 2M per os
x = jour J

B - Saccharose 2M
+chloramphenicol per os

Fig. 6B - Mécanisme de régulation à moyen Terme (Boucle du type cinétique à foyer stable) : Le contrôle de la Tréhalosémie par les tréhalases se déroule selon un amortissement oscillatoire.

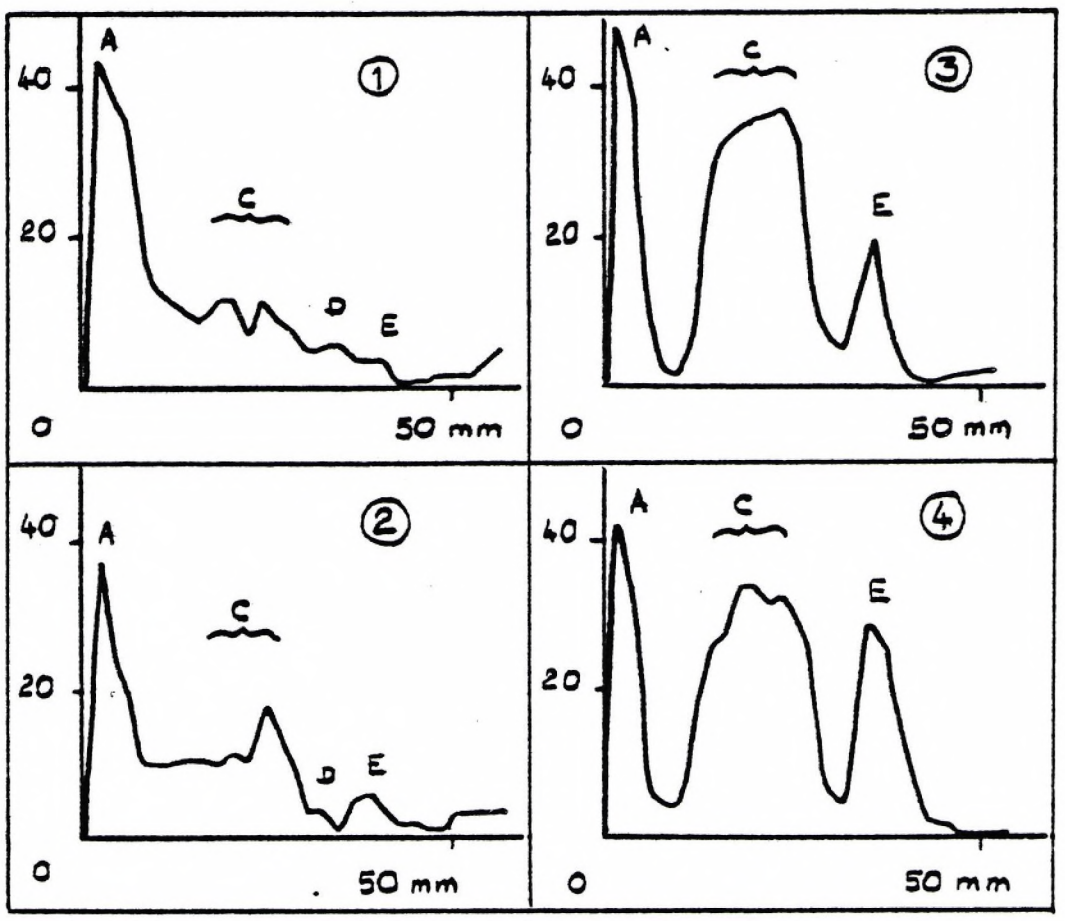


Fig. 7 _Formes moléculaires des saccharases (①·②) et des tréhalases (③-④) induites par le nourrissement au saccharose . ② et ④ : adjonction de Chloramphénicol

Tableau 3 - P.M. apparent des classes protéiques auxquelles correspondent les formes moléculaires osidasiques.

Classe	A	PM	488 000 à 570 000	soit : 1/1
Classe	C1	PM	228 000 à 250 000	soit : 1/2
Classe	C2	PM	167 000 à 183 000	soit : 1/3
Classe	D	PM	109 000 à 122 000	soit : 1/4
Classe	E	PM	90 000 à 99 000	soit : 1/6

L'action du chloramphénicol se traduit dans les deux cas par une réduction de la forme A au profit des formes C et E, ce qui pourrait correspondre partiellement à une dépolymérisation de la forme moléculaire la plus complexe. Il pourrait alors correspondre à ce phénomène des changements de propriétés cinétiques (perte de cooperativité) dont l'étude est actuellement en cours au niveau des pNP α-glucosidases.

II-3 ADAPTATION DES pNP-α-D-GLUCOSIDASES AUX VARIATIONS DE LA GLYCEMIE DE L'ABEILLE.

M. BOUNIAS et M.R.J. MORGAN

La possibilité d'effectuer une analyse cinétique très approfondie des pNP-α-glucosidases nous a amené à considérer tous les facteurs susceptibles d'interférer avec l'activité enzymatique dans le cadre de l'expérimentation : parmi les effecteurs possibles figuraient, en particulier : le tréhalose, le saccharose et le chloramphénicol. Ces trois composés sont actifs, à divers degrés, sur les pNP-α-D-glucosidases, et les résultats ont fait l'objet de publications dans chaque cas. Voici un résumé de l'ensemble des résultats, illustrés par les fig. 8 à 15 et les tableaux 4 à 8.

L'étude cinétique détaillée du mécanisme d'action des α-glucosidases se poursuivra en 1982, dans les 4 cas de traitements : tréhalose et saccharose, purs ou en présence de chloramphénicol.

Comptes rendus des séances de la Société de Biologie.
Extrait du Tome 175, n° 1, 1981, p. 46.

Printed in France.

Mécanisme d'action du tréhalose comme inhibiteur mixte de l'activité p.N.P. α-D-glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeille : étude cinétique *in vitro*.

par MICHEL BOUNIAS * et M. R. J. MORGAN **.

* *Laboratoire de Biochimie, I.N.R.A., Centre de Recherches d'Avignon, F 84140 Montfavet-Cantarel, France,*
** *Département des Sciences Biologiques, Université de Lancaster, Lancaster, Grande Bretagne.*

Résumé. — Le tréhalose se comporte comme un inhibiteur mixte de l'activité p.N.P. α-D-glucosidasique de l'hémolymphe de l'Abeille : dans des échantillons présentant des cinétiques initiales de type michaëlien, il abaisse la vitesse maximale V_M et augmente la valeur de la constante Km d'un même facteur, respectivement égal à 1,7 chez les naissantes et 1,3 chez les adultes. Les constantes de dissociation Ki et K'i correspondant respectivement à la fixation du tréhalose sur l'enzyme et sur le complexe (enzyme-substrat artificiel) sont égales à 62,5 et 168,7 mM chez les naissantes, et à 303,9 et 754,5 mM chez les butineuses. Le rapport K'i/Ki est invariant. Le coefficient de Hill de la fixation du tréhalose sur l'enzyme varie de 0,91 chez les naissantes à 1,38 chez les butineuses, ce qui concorde avec les tendances non michaëliennes déjà observées pour cette enzyme. La dose I_{50} passe respectivement de 98,3 mM à 358,3 mM. Cet accroissement, de même que celui des constantes de dissociation, coïncide avec la différence de tréhalosémie entre les naissantes et les butineuses des lots étudiés.

TABLEAU 4

Influence du tréhalose (110 mM *in vitro*) sur les paramètres cinétiques p.N.P. α-D-glucosidasiques de l'hémolymphe d'Abeilles naissantes, déterminés par différentes méthodes.

Méthode de calcul	Vitesse maximale µM. mn⁻¹. µl⁻¹		Constante Km mM		Coefficient de Hill (n)	
	Témoins	Tréhalose	Témoins	Tréhalose	Témoins	Tréhalose
Lineweaver-Burk	11,27	7,36	2,56	4,25	—	—
Hanes	11,58	8,06	2,66	4,83	—	—
Hofstee	11,69	7,82	2,72	4,59	—	—
Endrenyi (N = 3)	13,33	5,74	—	—	0,939	1,018
Bounias (N = 5)	12,19	7,37	2,92	4,46	0,995	1,020
Moyenne (N)	12,01 (5)	7,27 (5)	2,71 (4)	4,53 (4)	0,974 (8)	1,02 (8)
Ecart-type	0,72	0,81	0,13	0,21	0,041	0,036
Intervalle de confiance (5 %)	± 0,89	± 1,00	± 0,21	± 0,33	± 0,051	± 0,045
Signification (seuil 5 %)	+		+		—	

TABLEAU 5

Influence du tréhalose (200 mM *in vitro*) sur les paramètres cinétiques p.N.P. α-D-glucosidasiques de l'hémolymphe d'Abeilles butineuses, déterminésd'après différentes méthodes.

Méthode de calcul	Vitesse maximale µM. mn⁻¹. µl⁻¹		Constante Km mM		Coefficient de Hill (n)	
	Témoins	Tréhalose	Témoins	Tréhalose	Témoins	Tréhalose
Lineweaver-Burk	632,7	539,5	2,25	3,38	—	—
Hanes	709,9	532,1	2,74	3,32	—	—
Hofstee	677,6	522,5	2,47	3,21	—	—
Endrenyi (N = 3)	691,6	563,0	—	—	0,974	0,973
Bounias (N = 6)	683,6	527,1	2,60	3,25	0,980	1,003
Moyenne (N)	679,1 (5)	536,8 (5)	2,51 (4)	3,29 (4)	0,978 (9)	0,993 (9)
Ecart-type	25,6	14,2	0,18	0,065	0,022	0,044
Intervalle de confiance	± 31,7	± 17,6	± 0,29	± 0,10	± 0,017	± 0,034
Signification (seuil 5 %)	+		+		—	

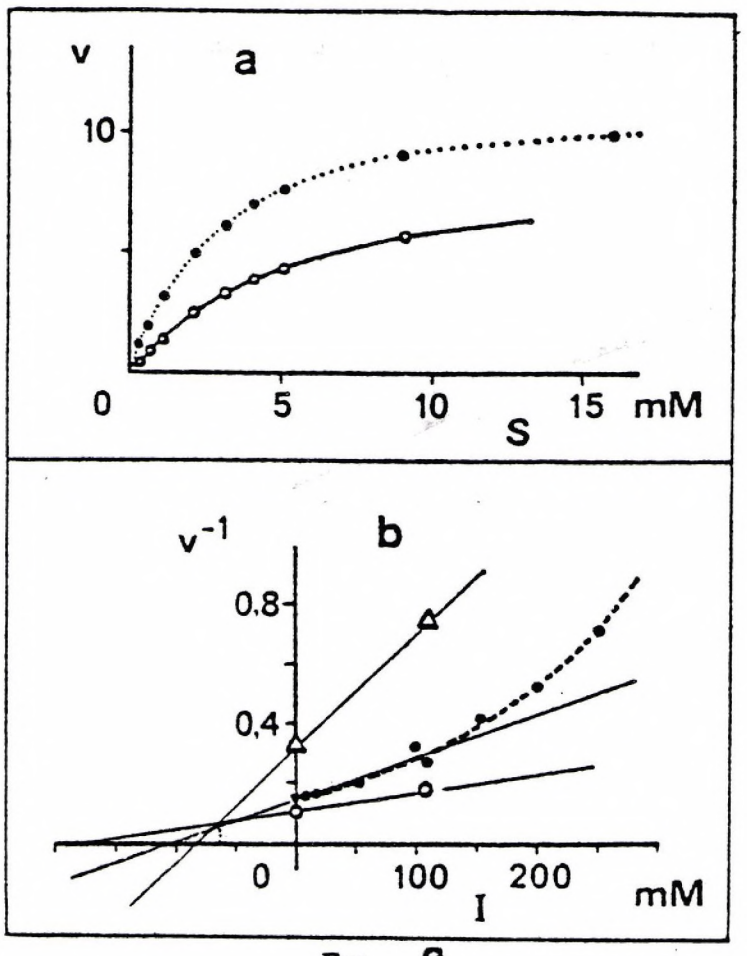


FIG. 8

Action du tréhalose *in vitro* sur l'activité p.N.P. α-D-glucosidasique de l'hémolymphe d'abeilles naissantes :

a) Courbes de saturation témoin (.. ● ..) et en présence de 110 mM de tréhalose (— ○ —). Les vitesses s'expriment en $\mu M.mn^{-1}.\mu l^{-1}$.

b) Relation entre la vitesse de réaction et la concentration en inhibiteur (I) (tréhalose) pour : (△) S = 1 mM ; (●) S = 4 mM ; (○) S = 9 mM.

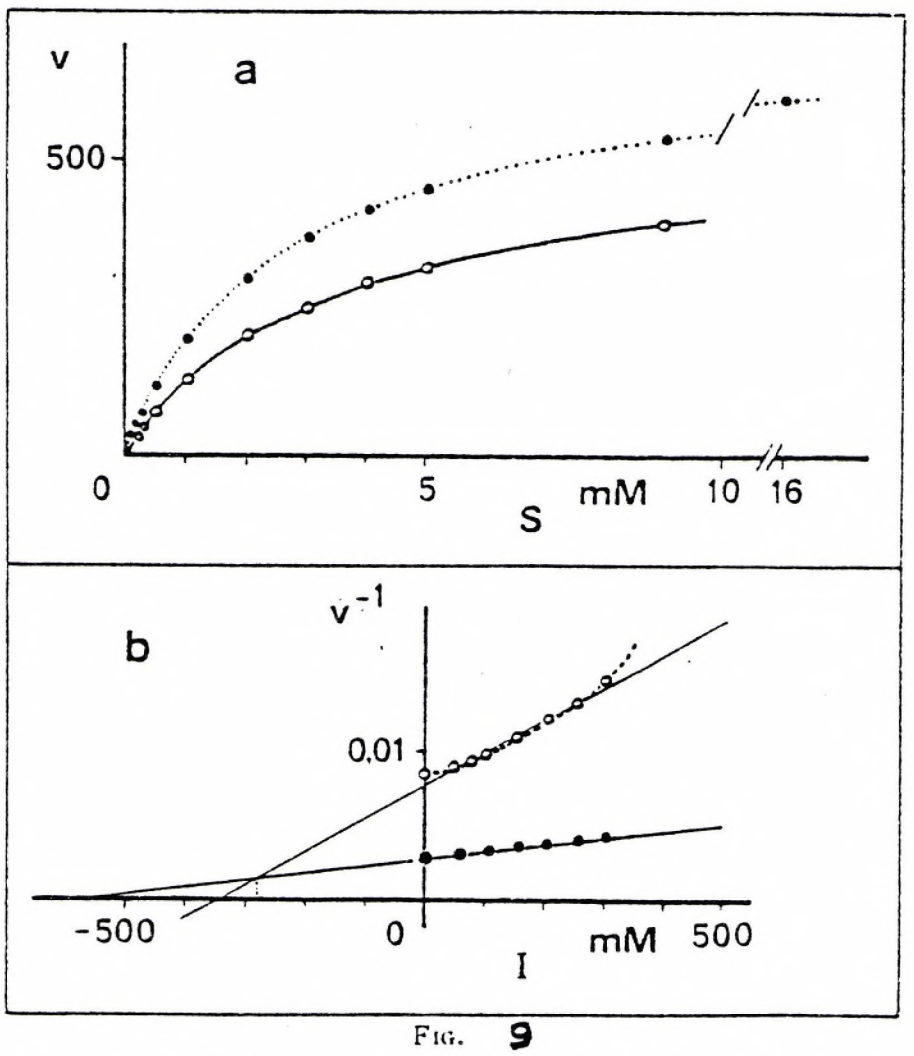


FIG. 9

Action du tréhalose *in vitro* sur l'activité p.N.P. α-D-glucosidasique de l'hémolymphe d'abeilles butineuses :

a) Courbes de saturation témoin (.. ● ..) et en présence de 200 mM de tréhalose (— ○ —). v s'exprime en $\mu M.mn^{-1}.\mu l^{-1}$.

b) Relations entre la vitesse de réaction et la concentration en inhibiteur (I) (tréhalose) pour : (○) S = 0,5 mM ; (●) S = 4 mM.

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE. – *Atténuation de l'inhibition mixte* (V + K) *de l'activité p-NP α-D-glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles par le tréhalose* in vitro, *au moyen d'un mécanisme compensateur de type* « *n* ». Note (*) de **Michel Bounias** et **Michael R. J. Morgan,** présentée par Jean Roche.

Dans un échantillon d'Abeilles naissantes dont l'activité *p*-NP α-D-glucosidasique de l'hémolymphe présente une cinétique initiale à coopérativité négative ($n = 0{,}92$) l'action inhibitrice du tréhalose se traduit par un abaissement du coefficient de Hill de la réaction ($n = 0{,}82$). En contrepartie, les manifestations d'inhibition de types V et K ($J_i = 1{,}05$; $I_{50} = 577$ mM) sont fortement atténuées par rapport à celles précédemment observées dans des cas michaëliens.

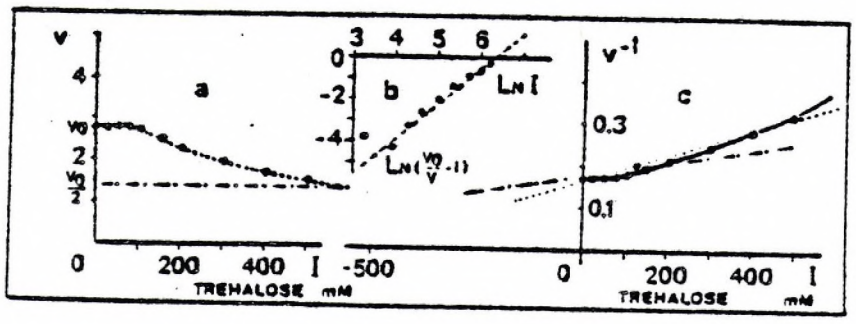


Fig. 10 – Relations entre vitesse de réaction (v : $\mu M . mn^{-1} . \mu l^{-1}$) et concentration en tréhalose (I, mM) (*a*) relation directe; (*b*) forme logarithmique d'après Chou [2]; (*c*) forme de Dixon [16] avec extrapolation illégitime (S = 3 mM).

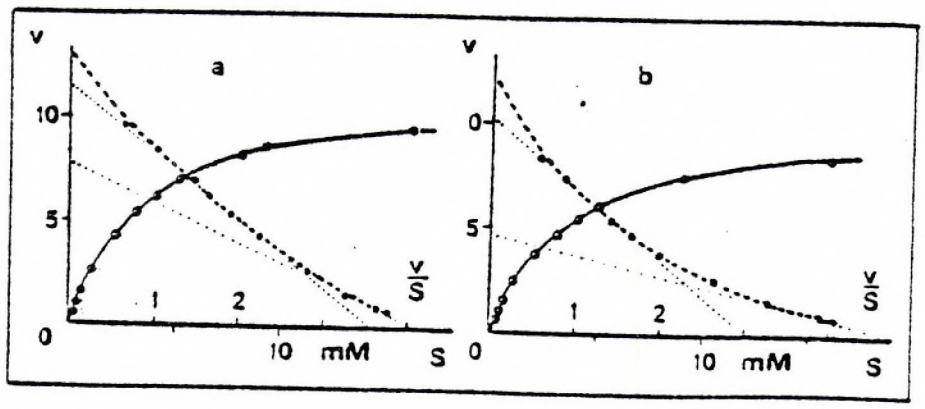


Fig. 11 – Courbes de saturation exprimées en coordonnées directes (—○—) et d'après Augustinsson [10] (---●---). Les extrapolations en trait pointillé figurent les composantes superposées selon Fonlupt, Martinet et Pachéco [11]. (*a*) témoins; (*b*) tréhalose : 125 mM *in vitro*.

TABLEAU 6

Action du tréhalose (125 mM in vitro) *sur les paramètres de Hill de l'activité p-NP α-D-glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles.*

Méthode de Calcul	Vitesse maximale ($\mu M . mn^{-1} . \mu l^{-1}$) C	Vitesse maximale ($\mu M . mn^{-1} . \mu l^{-1}$) Tr	Constante K (mM) C	Constante K (mM) Tr	Coeff. de Hill (n) C	Coeff. de Hill (n) Tr
Endrenyi (N = 3) :						
moyenne	12,40	12,13	3,46	3,70	0,939	0,817
écart-type	0,28	0,03	0,10	0,01	0,006	0,001
Bounias (N = 7) :						
moyenne	12,83	12,08	3,61	3,65	0,942	0,824
écart-type	1,57	0,57	0,56	0,20	0,030	0,018
Moyenne générale (N = 10)	12,70	12,10	3,56	3,66	0,941	0,822
Intervalle de confiance (5 %)	± 0,95	± 0,32	±0,34	±0,12	±0,017	±0,011

C, contrôle; Tr, + tréhalose.

Experientia 37 (1981), Birkhäuser Verlag, Basel (Schweiz)

An in vitro kinetic study of the mixed inhibition of honeybee hemolymph PNP-α-D-glucosidase by sucrose[1]

M. Bounias and M. R. J. Morgan

Biochemistry Laboratory, I.N.R.A., Avignon Research Center, F-84140 Montfavet (France), and Department of Biological Sciences, University of Lancaster, Lancaster (England), 5 March 1981

Summary. Sucrose acts in vitro as a mixed inhibitor of (V + K + n) type towards honeybee hemolymph PNP-α-D-glucosidase activity. Between the stages of emergence and foraging, there is little change in the effect of the inhibitor on V_M (f_i = from 1.31 to 1.35 respectively) or n (f_i = from 1.09 to 1.07) but K is more markedly affected (f_i^{-1} = from 1.17 to 1.87). These observations reflect the decrease of K_i from 277 to 98 mM and of I_{50} from 154 to 111 mM, but K'_i scarcely alters during development (from 477 to 425 mM). These inhibitory effects of sucrose are intermediate between those previously reported for trehalose and glucose.

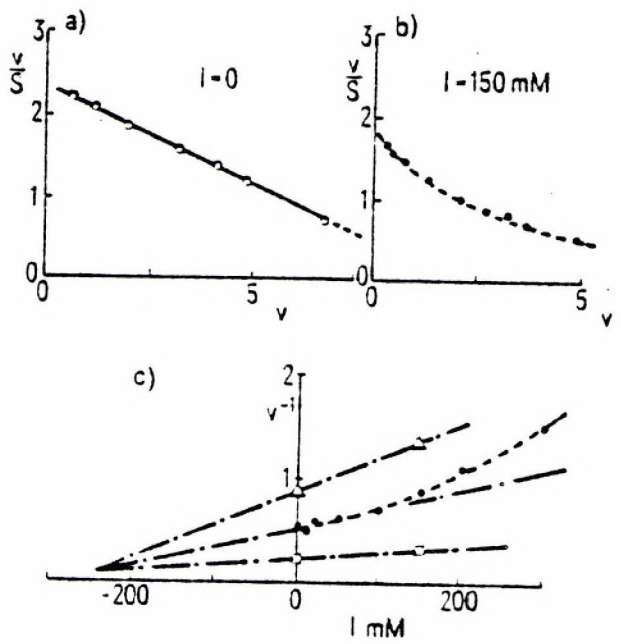


Figure 12 Kinetic effects of sucrose in vitro on the hemolymph PNP-α-D-glucosidase activity of emerging bees: Augustinsson plots for *a* control series, *b* sucrose-inhibited series; *c* Dixon plots at 3 substrate concentrations (S) = 0.5 mM (△), (S) = 1 mM (●), (S) = 4 mM (□).

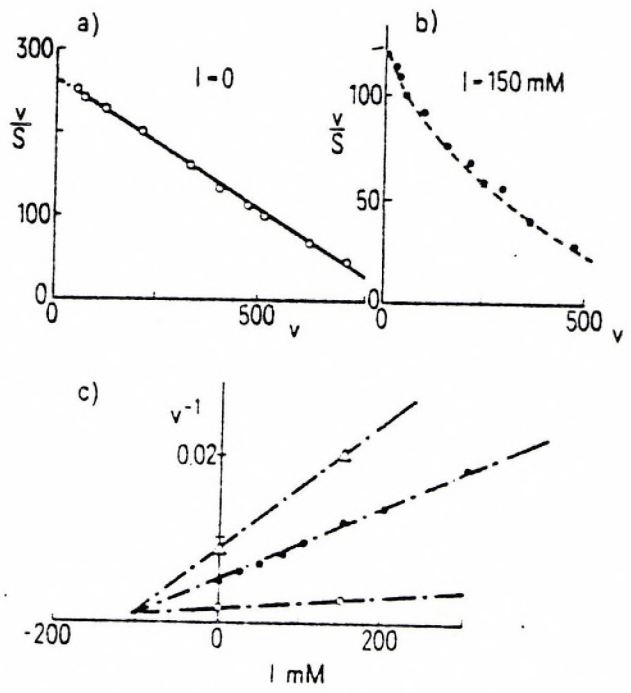


Figure 13 Kinetic effects of sucrose in vitro on the hemolymph PNP-α-D-glucosidase activity of foraging bees: Augustinsson plots for *a* control series, *b* sucrose-inhibited series; *c* Dixon plots at 3 substrate concentrations (S) = 0.5 mM (△), (S) = 1 mM (●), (S) = 9 mM (□).

Tableau 7

Modification of the kinetic parameters of honeybee hemolymph PNP-α-D-glucosidase activity by sucrose in vitro. V_M is expressed in $\mu M \cdot min^{-1} \cdot \mu l^{-1}$; K_m, K_i and K'_i in mM. The values in parentheses are standard deviations for N determinations

	Control (I) = 0	Sucrose-inhibited (I) = 150 mM	f_i	K_i	K'_i
Emerging bees					
N	5	6			
V_M	10.20(0.87)	7.76(1.31)	1.314		477.0
K or K_m	4.44(0.46)	5.21(1.04)	1.173^{-1}		
V_M/K	2.297	1.489	1.542	276.6	
n	0.980(0.029)	0.898(0.045)	1.091		
Foraging bees					
N	7	7			
V_M	830.8(79.6)	613.9(84.6)	1.353		424.5
K or K_m	3.10(0.39)	5.79(0.93)	1.868^{-1}		
V_M/K	268.0	106.0	2.528	98.19	
n	0.997(0.045)	0.936(0.035)	1.065		

Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie, 1981, 89, 000-000

24

Non-competitive inhibition of honeybee haemolymph pNP-α-D-glucosidase by chloramphenicol — a study *in vitro*

BY

M. BOUNIAS and M. R. J. MORGAN (1)

(1) *(Biochemistry Laboratory, INRA, Avignon Research Center, Montfavet, France and Department of Biological Sciences, University of Lancaster, Lancaster, UK)*

The haemolymph pNP-α-D-glucosidase activity of emerging worker bees shows a tendency toward negative cooperativity ($n = 0.92$). The relation between initial velocity and enzyme concentration is not exactly linear (bilogarithmic exponent = 0.91). Between 25° and 31 °C, the activation energy, $E_A = 38.2$ KJ/mol. Chloramphenicol administered *in vitro* decreases the maximum velocity and re-establishes pure Michaelian kinetics ($n \simeq 1.0$). The Hill coefficient for the binding of chloramphenicol to the enzyme, $n_1 = 1.13$; the values of $K_1 = 20.7$ mM, $K'_1 = 17.3$ mM, and $I_{50} = 17.6$ mM are not significantly different from one another. These data indicate that inhibition by chloramphenicol is of the pure, non-competitive type.

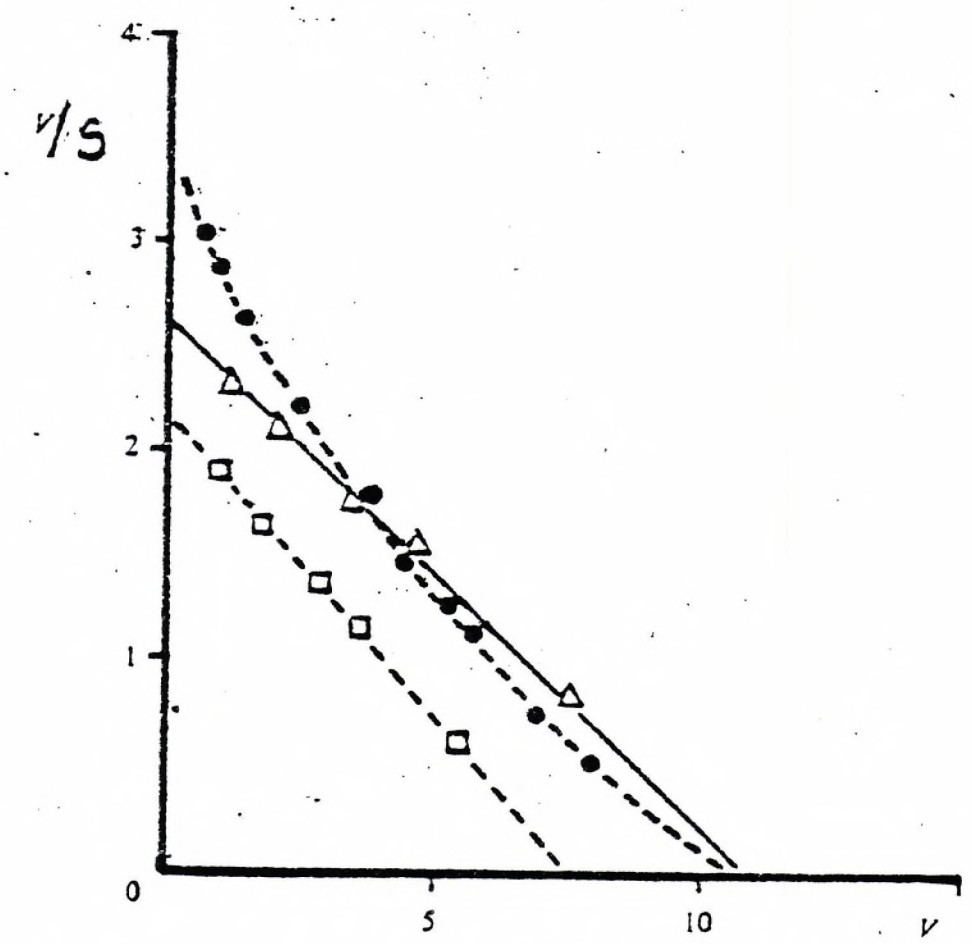


FIG. 14 *Augustinsson plots for the saturation of enzyme by substrate in the absence and in the presence of the inhibitor chloramphenicol.* Inhibitor concentrations : 0 (control series ● --- ●); 27 μM (△ —— △); 6.4 mM (□ --- □).

TABLE 8 *Action of chloramphenicol on the kinetic parameters of honeybee haemolymph pNP-α-D-glucosidase.* V_m is expressed in μmol min^{-1} μl^{-1} and K_m, K_i and K'_i in mM. Each value is quoted in the form of the mean of n determinations, with the standard deviation in parentheses. The significance of differences from the corresponding control values was assessed by t tests, a + sign in the table signifying $P < .05$.

	V_m	K (or K_m)	V_m/K	n
Controls, (I) = 0 ($n = 7$)	10.23(2.18)	3.67(0.75)	2.80(0.14)	0.920(0.044)
(I) = 0.027 mM ($n = 4$)	10.71(0.42)	4.10(0.20)	2.62(0.03)	1.019(0.010)
Significance	−	−	−	+
f_1	0.955	0.895	1.069	0.903
(I) = 6.4 mM ($n = 4$)	7.47(0.01)	3.48(0.04)	2.14(0.01)	0.993(0.010)
Significance	+	−	+	+
f_1	1.369	1.055	1.308	0.926
	$K'_i = 17.32$ mM		$K_i = 20.75$ mM	

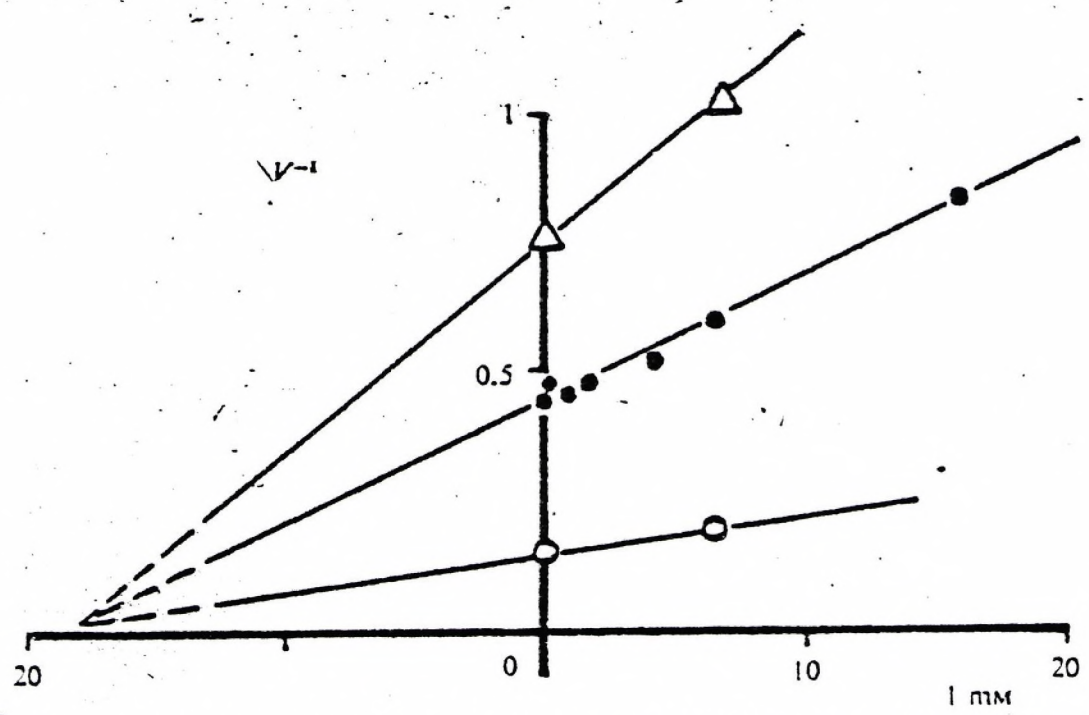


FIG. 15 *Dixon plots of the effect of the inhibitor chloramphenicol at three substrate concentrations :* (S) = 0.5 mM (△); (S) = 1 mM (●); (S) = 9 mM (ϕ).

L'ensemble de ces résultats apporte d'une part une série de confirmations des mécanismes moléculaires d'activité des α-glucosidases, et fournit d'autre part les bases très précises d'une interprétation des effets secondaires éventuellement superposés aux manifestations cinétiques de l'induction proprement dite.

C.R.Ann. Trav. Lab. BC, 10, 1981, Chap. III

III - ANOMALISTIQUE SPATIALE

CONTRAT / C.N.E.S.-G.E.P.A.N.

Les modifications biochimiques survenues dans les feuilles d'une luzerne sauvage (Medicago minima) par suite de l'approche d'un phénomène aérospatial non identifié (télex Gendarmerie de Draguignan et P.V. n°28 du 9.1.81) ont été analysées en fonction de l'éloignement des plants depuis le point le plus rapproché de l'objet.

Une série de résultats objectifs montrent des corrélations significatives au niveau des pigments chlorophylliens et caroténoïdes, ainsi que diverses modifications au niveau des co-facteurs photosynthétiques, des lipides, des glucides et des amino-acides. Différentes études enzymologiques complémentaires sont en cours de dépouillement. Conformément à la Convention passée avec le CNES, le détail de ces résultats reste, pour l'instant, confidentiel. Un premier rapport concernant l'Appareil Photosynthétique a été remis au GEPAN en fin d'année sous la référence suivante :

"Perturbations biochimiques observées en relation avec l'apparition d'un phénomène aérospatial non identifié chez une luzerne sauvage (Medicago minima)" (M. BOUNIAS) 1ère partie : Pigments et Co Facteurs photosynthétiques - 60 pages - 17 tableaux - 28 planches de figures.

Ce travail constitue une préparation logistique pour un programme futur de Phytopharmacie orienté vers la "pharmacovigilance" en matière de Végétaux d'intérêt agricole (collaboration avec le Laboratoire de Pollution d'Avignon et les Services de Biologie et de Chimie du Centre Universitaire, Faculté des Sciences).

C.R.Ann. Trav. Lab. BC, 10, 1981, Chap. IV

IV - CONTROLE HORMONAL DE LA GLYCEMIE DE L'ABEILLE

(Travaux en cours de Publication)

INTRODUCTION - Cette série de Recherches comprend deux phases :

- la première est consacrée à l'élargissement des travaux précédents (1978-1979) sur les pepdidergiques et les adrénergiques aux cas suivants :
  - Insuline endogène d'Abeille
  - Octopamine
  - AMP cyclique
  - β bloquants : propranolol (seul ou en interaction avec Noradrénaline ou glucagon)
  - Adrénochrome (études Physico-chimiques et biochimiques)
- la seconde partie traite de l'action de la somato-statine sur les effets des autres facteurs hormonaux au niveau de la glycémie et de la lipémie de l'Abeille.

IV-1 ACTION DE L'INJECTION DE SERUM PHYSIOLOGIQUE SUR LA GLYCEMIE ET LA LIPEMIE DE L'ABEILLE

M. BOUNIAS

Des résultats antérieurs avaient montré que l'injection d'eau distillée pouvait provoquer, chez l'Abeille naissante, certains effets de type "adrénergique". Nous avons voulu examiner les conséquences que pourrait avoir l'injection d'un sérum physiologique spécialement adapté à l'Abeille.

Selon BISHOP et al (J.Biol.Chem., 1925, 66, 77-88), l'hémolymphe d'Abeille contiendrait comme cation principal : K^+ (24,5mM), le Na^+ n'étant présent qu'à 6mM. L'anion Cl^- est présent, quant à lui, à la concentration de 45 à 55mM.

Notre sérum a donc été composé de la façon suivante :
K Cl : 20 mM
Na Cl : 5 mM
HCl : QSP...pH 6,8 (4 mM)

Différentes séries d'injections intra abdominales ont été opérées. Les résultats partiels obtenus au stade actuel de l' avancement des calculs sont indiqués dans le tableau 9.

Il se produit donc une série d'oscillations hyper- et hypoglycémiques et lipidiques. Ces effets ont été comparés à ceux provoqués par une simple piqûre sans injection de liquide. Les résultats provisoires figurent dans le tableau 10.

Les variations de la glycémie apparaissent donc comme négligeables au niveau du tréhalose, tandis qu'une hypoglycémie (+100%) se manifeste après 2H 15 et persiste encore (+30%) au bout de 3H.

Ceci tend à montrer que le sérum, comme l'eau déionisée stabilisée à pH 6,8 produisent, au niveau du glucose, des effets voisins qui résultant en grande partie de l'effet traumatique de la piqûre. Au niveau du tréhalose, les répercussions s'aggravent dans le sens : piqûre sans injection → injection de sérum → injection d'eau déionisée. Les solutions fortement ioniques, acides ou basiques entraînent des perturbations beaucoup plus graves.

tableau 9 - Variations de la glycémie et de la lipémie consécutives à l'injection de sérum chez l'Abeille naissante. (S.D pour N = 5 détn.)

Temps	Tréhalose mM	Glucose mM	Phospho Lipides(µg)	Stéroïdes (ng/ul)	Diglycérides 1-2(ng/µl)	Diglycérides 1-3(ng/µl)
0	31,7( )	3,7(0,9)	1,9	19	11	3,4
5mn	25,6(7,8)	4,2(0,9)	1,07	11	7,5	2,1
30-45mn	33,5(16,8)	4,8(1,1)	1,2	15	9,6	5,9
1H	30,0(0,1)	3,5(0,5)	-	-	-	-
1H 30	11,8(7,4)	2,2(0,3)	1,7	12	18	8
2H-2H 15	24,1(11,8)	5,8(2,1)	2,0	16	14	5
2H 30	24,8(1,0)	3,6(0,1)	-	-	-	-
3H	22,9(6,3)	4,6(1,7)	1,8	11	14	6

Lots d'Abeilles : Avril/ Mai/ Juin : 100 Ab $\overline{P}$ = 123± 2mg
80 Ab $\overline{P}$ = 127± 1,8mg
100 Ab $\overline{P}$ = 117,7± 1,1mg

tableau 10 - Variations de la glycémie et de la lipémie consécutives à la piqûre abdominale par l'aiguille de la seringue, sans injection de liquide.

Temps	Tréhalose	Glucose	Phospho Lipides	Stéroïdes	Diglycérides 1-2	Diglycérides 1-3
0	24,6	3,6	inachevé à la rédaction de ce C.R.			
8mn	32,4	5,3				
45mn	24,8	2,9				
1H 30	23,3	3,7				
2H 15	24,2	7,2				
3H	27,5	4,7				

IV-2 LES DIGLYCERIDES DE L'HEMOLYMPHE D'ABEILLE :

A- Relation structure/transport et technique d'extraction

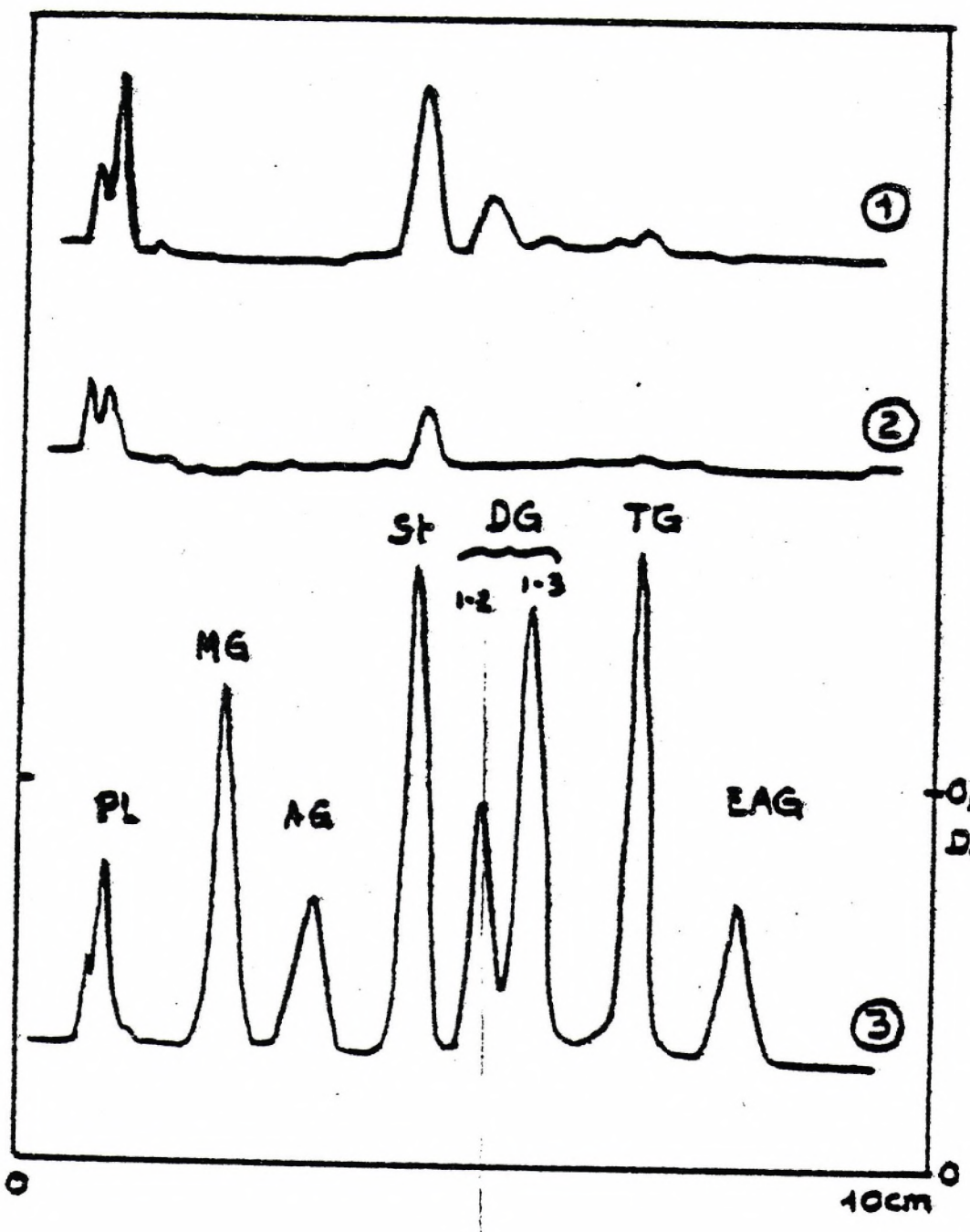
L'hémolymphe est un milieu (ou tissus) aqueux : il est donc peu vraisemblable que les lipides y circulent librement.

L'extraction directe par action du chloroforme sur l'hémolymphe brute donne de très bons résultats (cf. C.R.Ann. 9, 1980) mais par contre, après élimination des protéines par floculation en milieu alcoolique 40% et centrifugation, le surnageant ne contient plus que des traces de stéroïdes et de phospholipides, substances qui présentent un coefficient de partage non négligeable avec l'eau, en raison de la présence de radicaux polaires sur leurs molécules. La fig. 16 illustre la comparaison des extractions lipidiques opérées sur le surnageant et dans le culot protéique respectivement. (série "INSULAB" du 30-4-81).

Il apparait ainsi que les lipides circulent dans l'hémolymphe sous la forme de complexes liés à des protéines, ces complexes étant labiles par les solvants lipophiles. Par ailleurs, la forme dominante des glycérides est celle des Di-Glycérides 1-2. Ceci confirme les conclusions de Hill et al. (1972), de Bailey et al. (1972), de Mayer et Candy (1969) et de Cook et Eddington (1967) sur le transport des acides gras sous forme de diglycérides principalement. La forme 1-2 nous parait la plus appropriée car elle laisse un radical OH libre, complexable plus facilement en position 3 qu'en position 2 où les chaines "grasses" risquent de provoquer un encombrement stérique, selon l'orientation des liaisons (fig. 17).

La présence de diglycérides 1-2 à concentrations relativement élevées a été également signalée par Chippendale (1973) chez un autre insecte : Sitotrosa cerealella. La forme D-α - β-Diglycéride semblerait être synthétisée en priorité par l'insecte (Candy et Kilby : Insect Biochem. and Funct., 1975, p. 134).

32. C.R. Ann. Trav. Lab. BC - 10, 1931, Chap. IV-2 -



① Extrait du culot protéique
(équivalent de 2 µl d'hémolymphe)

② Extrait du surnageant
(équivalent de 2 µl d'hémolymphe)

③ Etalons : série C18:1
sauf AG: C16:1 -

PL = Phospholipides 5 µg
MG = Monoglycérides 5,35 µg
AG = Ac. gras : 2,55 µg
St = cholestérol : 1 µg
DG = Diglycérides 1-2 : 0,93 µg
" 1-3 : 5,27 µg
TG = Triglycérides : 3,55 µg
EAG = Ester Me d'ac. gras : 3 µg

- FIG. 16 -

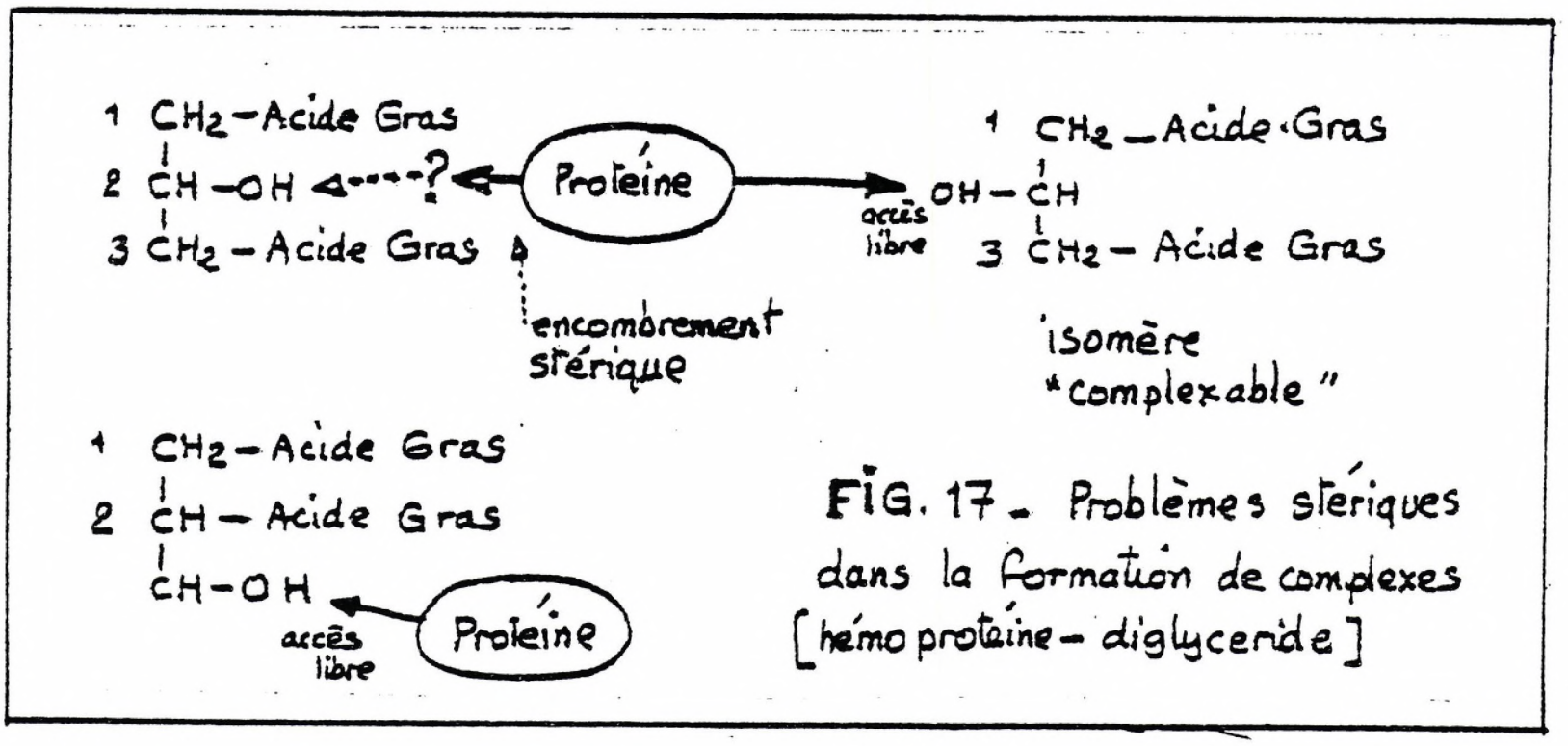


FIG. 17 - Problèmes stériques dans la formation de complexes [hémoprotéine - diglyceride]

B- Extraction

L'extraction des lipides à partir du culot protéique est réalisable sur de micro quantités (10 à 50 µl d'hémolymphe, à l'origine), en faisant appel à l'action des ultra-sons.

Le culot protéique est immergé dans un volume de solvant chloroforme-méthanol (80-20) égal au double de celui du volume initial d'hémolymphe. L'opération se déroule dans un micro-tube de verre de 4 mm de diamètre et 3 cm de hauteur, environ.

Six échantillons sont traités respectivement par : 0-1-2-3-4 et 5 passages de 2 mn dans une cuve à ultrasons (Bransonic 52, de 100 W). Les cinétiques d'extraction des principales catégories de lipides présents sont illustrées par la fig. 18. Il apparait que 4 à 6 mn de traitement permettent d'extraire de 76 à 97% des lipides selon les classes.

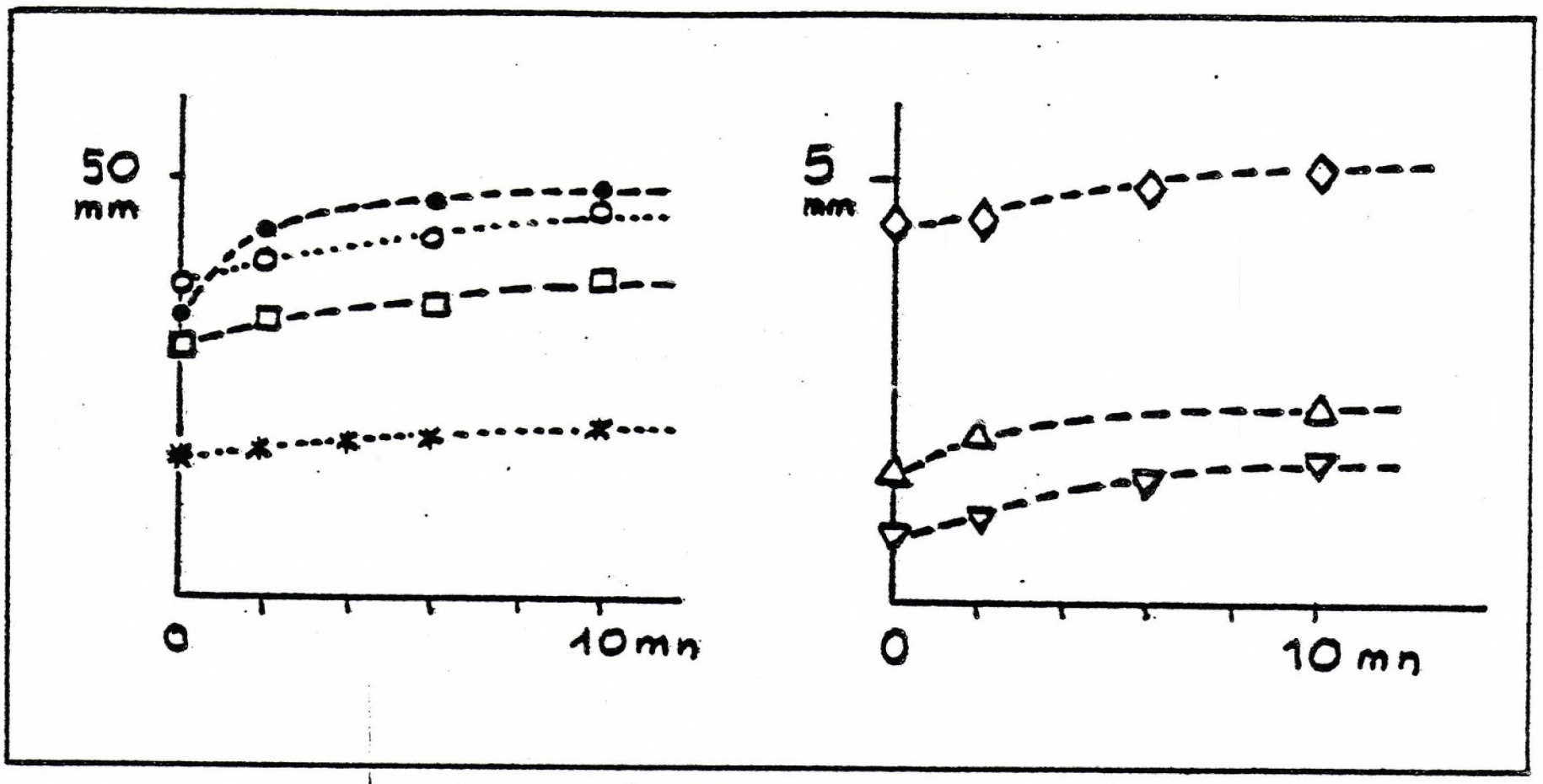


FIG. 18 - Extraction des Lipides associés aux protéines "transporteuses" de l'hémolymphe d'Abeilles en fonction du temps total de traitement aux ultra-sons (par fractions de 2mn)

○ : PL - ▽ : AG type C16 - □ : DG 1-2

● : St - △ : AG type C18 - ◇ : DG. 1-3

✱ : TG -

(Série S/Ψ - 22.5.81)

IV-3 INFLUENCE DU JEÛNE SUR LA GLYCEMIE ET LA LIPEMIE D'ABEILLES NAISSANTES

Les expériences d'injections d'effecteurs hormonaux peuvent porter sur des durées de 4 à 12H, parfois davantage, éventuellement. Dans ces conditions, les effets physiologiques et biochimiques du jeûne risquent de devenir significatifs : c'est ce qui a été vérifié ici.

Les Abeilles naissantes sont prélevées dans les alvéoles encore operculées (stade Ao) et groupées par 10 dans des tubes de Borel comportant une paroi de papier-filtre humide sur le tiers de la circonférence, environ. Elles sont placées à l'obscurité à 22°C pendant des durées de : 0-7 heures - 30 heures - 48 heures.

Les résultats obtenus jusqu'ici sont indiqués dans le tableau 11. Les changements intervenant en deça de 4 heures ne se sont pas avérés significatifs.

Le jeûne affecte assez profondement la glycémie et la lipémie, avec une première chute assez générale au temps 7 heures, suivie d'une remontée vers 30 heures, puis d'une nouvelle chute très importante au bout de 48 heures. Deux fractions échappent à cette tendance et montrent une grande stabilité : une fraction de mobilité légèrement inférieure à celle des stéroïdes, qui pourrait correspondre à des acides gras à longues chaines ($\geqslant$ C18) et une fraction correspondant à des triglycérides comprenant au moins une chaine courte (C12 à C16 environ).

chap. IV-3 (suite)

tableau 11 - Influence du jeûne sur la glycémie (mM) et la lipémie (valeurs relatives) d'Abeilles naissantes. [%] = valeurs relatives internes des classes de lipides

Durée du jeûne		0	7 heures	30 heures	48 heures
Tréhalose mM		32,4	15,3	23,3	2,7
Glucose mM		5,3	3,3	7,8	1,5
Phospho lipides		1 [37%]	0,69	0,96	0,59
Mono glycérides		1 [0,8%]	1,5	1,0	1,0
Ac. gras : type	C16	1 [1,6%]	0,5	1,5	0,2
	> C16	1 [0,8%]	1,0	ε	0,4
	"lourds"	1 [2,8%]	1,43	1,14	1,0
Stérofdes		1 [30,6%]	0,47	0,74	0,12
Diglycérides	1-2	1 [19,2%]	0,45	0,56	0,19
	1-3	1 [2,1%]	0,37	0,74	0,18
Triglycérides	~ C18	1 [ε,6%]	0,57	0,71	0,46
	< C18	1 [5,6%]	1,0	1,0	1,07

IV-4 ACTION DE L'INSULINE ENDOGENE SUR LA GLYCEMIE ET LA LIPEMIE DE L'ABEILLE

(M. BOUNIAS, L. GOURDOUX*et R. MOREAU*)
*Université de Bordeaux I - Laboratoire d'études du METABOLISME

L'équipe de Mme GOURDOUX et M. MOREAU a isolé chez l'Abeille et partiellement purifié, en 1980, un peptide immunologiquement semblable à l'insuline de Rats. Des préparations lyophilisées de ce composé ont été acheminées au LBC où leur mode d'action a été analysé chez l'Abeille naissante, par injections.

L'équivalence entre l'activité et le poids de substance a été assimilée, ici, à celle déterminée chez les Vertébrés. Nous avons donc retenu, ici, pour l'instant la valeur de 5.10^{-2} ng par µU.

Plusieurs séries d'injections ont été opérées au cours d'une période s'étendant sur 2 mois. Les doses : 0,1 ; 0,5 et 2,5 µU par Abeille ont été injectées successivement. Les écarts entre répétitions pour une même dose sont de l'ordre de ± 9%.

Le tableau 12 résume les données numériques déjà extraites au stade actuel du dépouillement des enregistrements effectués.

L'insuline d'Abeille provoque chez l'Abeille une hypoglycémie plus rapide que l'hormone extraite de Vertébrés. La dose la plus faible entraine une réponse légèrement plus lente que les deux autres. La dose la plus élevée provoque une hyperglucosémie compensatrice rapide (30mn). La valeur 0,5 µU par Abeille parait correspondre à une réponse optimale.

Chez les lipides, les concentrations des phospholipides, des stéroïdes, des diglicérides 1-2 et des triglycérides baissent également. Les acides gras et les DG. 1-2 accusent une baisse de courte durée suivie d'une remontée.

Il existe certainement entre l'insuline de l'Abeille et celle des mammifères des différences structurales perceptibles au moins à deux niveaux : 1° les récepteurs insuliniques
2° les "insulinases"

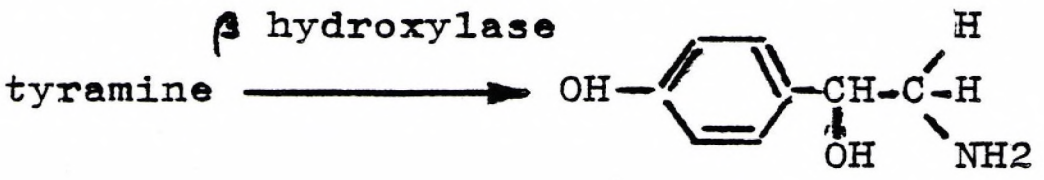
tableau 12 - Action de l'injection d'insuline endogène sur la glycémie et la lipémie de l'Abeille. Les écarts types sont donnés entre parenthèses pour N = 5 mesures.

	0	5-10mn	30-45mn	1H 30	2H-2H 15	3H
Tréhalose mM						
0,1 µU	39,1(5,4)	27,8	17,0	16,6	19,0	29,2
0,5 µU	31,3(2,7)	16,6	20,0	25,1	11,9	8,5
2,5 µU	39,1(5,4)	16,0	25,7	20,5	24,6	21,6
Glucose mM						
0,1 µU	4,2(1,6)	3,9	3,1	1,7	2,1	3,8
0,5 µU	3,7(0,7)	3,1	3,6	3,3	3,4	2,5
2,5 µU	4,2(1,6)	1,9	5,8	3,4	7,6	2,8
LIPIDES * / DOSE 0,5 µU par Abeille						
Phospho lipides	2,2(0,3)	0,77	1,2	1,45	1,40	0,82
Acides gras	1,4	0,8	1,5	1,4	0,6	0,3
Stéroïdes *	0,20	0,087	0,080	0,11	0,09	0,09
Diglycérides 1-2*	54,0	15,5	25,4	36,7	11,3	15,3
Diglycérides 1-3*	2,2	1,1	1,6	3,9	3,9	3,9
Triglycérides *	1,5	0,04	0,05	0,05	0,08	0,14

* Unités arbitraires

IV-5 INFLUENCE DE L'OCTOPAMINE SUR LA GLYCEMIE ET LA LIPEMIE D'ABEILLES NAISSANTES

L'octopamine présente une structure dérivée de celle des adrénergiques, mais elle diffère des catécholamines proprement dites par sa structure mono-hydroxy benzénique (fig. ci-contre)



octopamine ou
p. hydroxyphényléthanolamine

Cette substance a été découverte et identifiée en 1952 par ERSPAMER (Nature, 169, 375) dans les glandes salivaires de la pieuvre Octopus vulgaris. Elle a été identifiée assez longtemps après dans les nerfs de mammifères (MOLINOFF et AXELROD, 1969, Science, 164, 428) et enfin, plus récemment, chez la Blatte (NATHANSON et GREENGARD, 1973, Science, 180, 308).

En 1963, KOROL et SOFFER (the Pharmacologist, 5, 247) ont montré la fonction adrénergique de l'octopamine sur la physiologie cardio-vasculaire, puis SAAVEDRA et al., en 1974 (Science, 185, 364) ont suggéré son rôle comme neurotransmetteur chez les Invertébrés. Le rôle de l'octopamine comme activateur de l'Adénylate-cylase a été récemment montré chez le criquet par DAVID et FUZEAU-BRAESCH, 1979 (C.R.Acad.Sc., 288D, 1207). Ces auteurs ont observé un effet supérieur à celui de la nor-adrénaline, sans pouvoir classer les récepteurs octopaminergiques dans l'une des catégories α ou β .

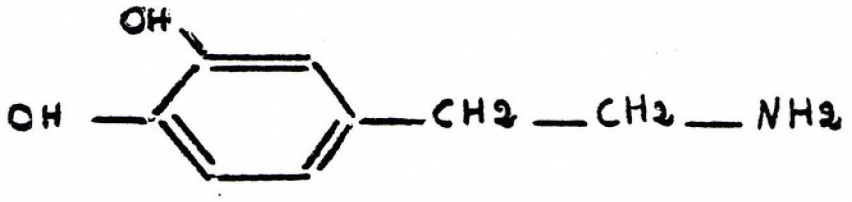
Au cours de nos expérimantations, nous avons injecté des doses de 0,1 et 1 nmoles par Abeille, cette dernière dose étant significativement hyperglycémiante dans le cas des adrénergiques (BOUNIAS et PACHECO, C.R.Ac.Sc., 1979; BOUNIAS, Arch Int.Physiol.Bioch.,1980) 90 Abeilles d'un poids moyen P=128,3 $\pm$ 1,4mg ont été utilisées. Les résultats observés au niveau de la glycémie et de la lipémie sont présentés dans le tableau 13.

chap. IV-5 (suite)

tableau 13 : Action de l'injection d'octopamine sur la glycémie et la lipémie d'Abeilles naissantes.

	Go	5mM	45mM	1H 30	2H 15	3H
GLUCIDES						
DOSE 0,1						
Tréhalose mM	34,7	32,8	31,3	32,2	33,4	24,5
Glucose mM	6,2	6,4	5,0	9,8	11,5	8,5
DOSE 1						
Tréhalose mM	34,7	39,5	31,1	27,8	40,3	13,1
Glucose mM	6,2	5,8	8,0	10,2	8,8	5,9
LIPIDES * (unités arbitraires)						
DOSE 1,0						
Phospho lipides	6,3	7,1	6,0	6,1	7,75	5,0
Mono glycérides	2,2	2,2	3,6	0,8	1,3	4,4
Acides gras	1,6	1,0	1,0	1,0	0,6	0,75
Stéroïdes	0,071	0,11	0,076	0,042	0,088	0,027
Diglycérides 1-2	0,14	0,23	0,12	0,06	0,17	0,05
Diglycérides 1-3	0,013	0,023	0,016	0,011	0,019	0,004
Triglycérides	2,8	12,7	7,2	3,1	9,3	0,98
Esters de stéroïdes	11,5	15,0	7,0	5,3	14,2	4,9

Les deux doses d'octopamine provoquent chacune une hyper - glucosémie, dont le maximum (+85%) est atteint plus tard (d'environ 45mn) dans le cas de la dose la plus faible. Cette dernière n'induit pas d'hyper tréhalosémie tandis que la dose 1 se traduit par une augmentation de +16% seulement. Au bout de 3H apparait une hypo-tréhalosémie plus marquée avec la dose la plus forte. Les effets glycémiques de l'octopamine sont donc, ici, plus faibles et plus tardifs que ceux de l'adrénaline et de la noradrénaline. Ils paraissent comparables à ceux de la "dopamine" :



qui se présente comme un homologue supérieur isomère de l'octopamine, ceci pouvant partiellement expliquer cela.

Au niveau des lipides, la dose:1 nmole par Abeille n'entraine que peu de modifications des phospholipides, monoglycérides, diglycérides, stéroïdes, qui subissent des fluctuations oscillatoires du type de celles provoquées par l'injection de sérum. Par contre, les acides gras baissent tandis que les triglycérides s'établissent dès les premières minutes, à un niveau très élevé, (+353%) pour ne s'abaisser qu'au bout de 3H. Il semblerait donc que ce soit au niveau de la mobilisation des lipides sous ce forme de triglycérides, et temporairement de diglycérides, que l'octopamine est la plus active chez l'Abeille, Insecte à métabolisme energétique à dominante glucidique (au contraire du criquet).

L'octopamine voit ses effets glycémiques neutralisés par un β bloquant : le propanolol (tableau 16) elle agit donc bien sur des récepteurs de type β .

IV-6 ACTION DE L'INJECTION D'AMP CYCLIQUE SUR LA GLYCEMIE ET LA LIPEMIE DE L'ABEILLE

L'adrénaline comme le glucagon ont pour effet d'activer l'adénylate cyclase qui transforme l'ATP en AMP cyclique +(PP), ce qui constitue le point de départ d'une série de réactions conduisant à la glycogénolyse, avec libération de glucose. Le but de cette expérience est d'éprouver l'activité directe de l'AMP cyclique sur la glycémie de l'Abeille, sachant que la biosynthèse de cet effecteur a été étudiée chez des Diptères (CATALAN et al., 1975, BBRC, 65, 385), des Lépidoptères (FILBURN et WYATT, 1976, J.Insect Physol., 22,1635-1640) et des Orthoptères (ACHAZI, HAAKSHORST et al., 1977, Insect Biochem., 7, 21-26).

Un lot de 100 Abeilles d'un poids individuel P=123,7 ± 1,1mg a été utilisé au cours de ces expériences. L'AMP cyclique libre n'étant pas suffisamment soluble en milieu aqueux, c'est le dibutyryl-AMP-C. qui a été utilisé aux doses 0,5 et 2 nmoles par Abeille. (les doses actives chez les Vertébrés étant supérieures à celles des adrénergiques ...)

Les premiers résultats actuellement dépouillés sont présentés dans le tableau 14.

L'AMP cyclique provoque une hyper tréhalosémie très rapide (5mn) suivie d'une hyper glucosémie 45mn après injections. L'action de la dose la plus élevée est moins marquée, comme dans le cas d'une inhibition par excès de substrat. Les effets sont comparables à ceux de l'adrénaline, plus rapides même au niveau du tréhalose (pic à 15mn). Leur amplitude maximale (+100%) est comparable, pour ce dernier, mais inférieure dans le cas du glucose.

Au niveau des lipides, les phospholipides, les stéroïdes et les diglycérides augmentent à partir du temps 45mn et subissent des oscillations parallèles à celles des glucides. Les acides gras ont, au contraire, tendance à baisser (peut être sont-ils en partie mobilisés directement sous forme de glycérides).

tableau 14 : Action de l'injection de dibutyryl-AMP cyclique sur la glycémie et la lipémie de l'Abeille.

	0	5mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
GLYCEMIE						
DOSE 0,5						
Tréhalose mM	18,8	33,7	34,5	16,4	28,8	21,2
Glucose mM	3,5	3,17	6,9	6,5	5,6	4,2
DOSE 2						
Tréhalose mM	18,8	24,5	30,9	15,2	27,5	24,1
Glucose mM	3,5	2,8	5,9	3,6	6,7	3,4
LIPEMIE *						
DOSE 0,5						
Phospho lipides	5,8	4,9	10,6	6,5	14,2	5,6
Ac. gras	63	75	55	33	28	40
Stéroïdes	21,0	7,4	31,0	16,0	32,0	8,3
Diglycérides 1-2	31	23	53	21	47	16
Diglycérides 1-3	1,0	0,4	1,5	1,0	1,5	0,4

* Unités arbitraires

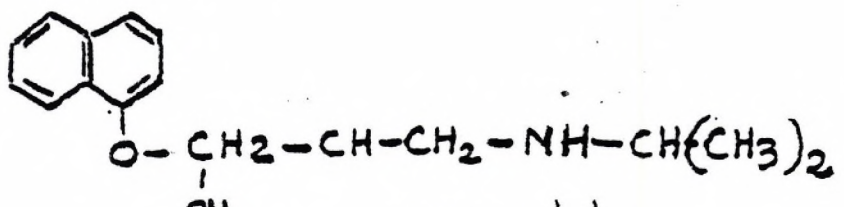
L'AMP Cyclique se présente donc bien comme un effecteur du métabolisme énergétique glucido-lipidique de l'Abeille. Son action rapide est conforme à son rôle de messager normalement induit par l'action hormonale, dont le temps d'action est ici supprimé par un effet de "court-circuit" artificiel.

[Voir chap. IV-9-F, p. 65]

IV-7 ACTION D'UN β -BLOQUANT : LE PROPRANOLOL, SUR LES EFFETS ADRENERGIQUES CHEZ L'ABEILLE

Le propranolol (isopropyl-amino-1-(naphthoxy-1)-3-propanol-2, chlorhydrate, P.M. = 295,8 / Sigma Réf. P-0884) est un agent de blocage des β récepteurs, utilisé en médecine pour combattre certaines manifestations adrénergiques dans des cas pathologiques (hypertension, cardiopathies).

L'action du propranolol a été étudiée par injection de la molécule pure, en solution dans le sérum, ou en présence de noradrénaline, d'octopamine, et de glucagon, c'est à dire d'effecteurs hyperglycémiants supposés agir par la voie de la glycogénolyse AMP cyclique dépendante.



propranolol

A- Propranolol seul

tableau 15 - Action du propranolol (2,5 nmole par Abeille) sur la glycémie et la lipémie de l'Abeille.
(100 Abeilles - $\bar{P}$ =119,5 ± 1,3 mg)

TEMPS	0	10mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
Tréhalose mM	14,9	25,6	24,0	30,2	21,1	17,8
Glucose mM	3,13	3,2	3,6	3,7	3,24	4,2
Phospho lipides *	3,8	9,6	5,2	7,4	2,2	3,6
Mono glycérides	6,6	5,1	2,0	3,2	6,6	6,6
Ac. gras	1,8	0,9	1,8	1,25	0,55	1,43
Stéroïdes	15,7	56,3	17,8	43,0	6,1	14,6
Diglycérides 1-2	28	71	37	82	11	26
Diglycérides 1-3	2,3	5,0	2,9	3,6	0,96	1,5
Triglycérides	1,7	2,1	2,5	3,6	1,2	2,1

* Lipides : unités arbitraires

B- Propranolol + noradrénaline (1 nmole par Abeille)

tableau 16 - Action du propranolol sur les effets adrénergiques de la noradrénaline chez l'Abeille.
cf. tableau 19 : action de la noradrénaline pure

TEMPS	0	10mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
Tréhalose mM	15,0	25,3	23,1	27,4	26,3	27,4
Glucose mM	3,1	2,9	4,2	3,4	3,7	4,3
Phospho lipides *	5,7	2,0	2,3	8,7	2,8	4,7
Monoglycérides	5,2	4,8	3,8	4,5	2,2	3,8
Acides gras	2,7	2,3	2,7	4,2	1,7	2,4
Stéroïdes	19,0	2,3	3,8	26,0	3,8	13,1
Diglycérides 1-2	58,0	22,0	20,5	76,0	20,5	44,0
Diglycérides 1-3	2,6	0,6	0,6	1,4	0,7	1,05

* Lipides : unités arbitraires.

Le propranolol neutralise très efficacement les effets hyperglycémiants adrénergiques, soit endogènes (piqûre), soit provoqués par l'injection de noradénaline. Les lipides subissent, de leur côté, des oscillations sans corrélation évidente avec les glucides. Les récepteurs adrénergiques de l'Abeille paraissent donc bien de type "β".

C- Propranolol + octopamine

tableau 17 - Action du propranolol sur les effets adrénergiques de l'octopamine.
(90 Abeilles - $\widetilde{P}$ = 122,8 ± 1,7 mg)
Comparer avec l'octopamine seule : tableau 13

TEMPS	0	10mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
Tréhalose mM	43,8	21,0	30,3	14,3	22,3	18,5
Glucose mM	8,5	8,4	8,4	3,6	6,5	5,3
Phospho lipides *	3,9	4,0	3,0	1,6	2,6	1,8
Stéroïdes	38,0	32,0	22,1	8,1	21,3	12,0
Diglycérides 1-2	25,0	19,0	23,0	9,2	19,0	18,0
Diglycérides 1-3	13,0	10,4	10,4	11,2	22,1	22,1

* lipides : unités arbitraires

Les hyper-glucosémies apparues au bout de 1H 30 à 2H 15 avec l'octopamine disparaissent. De plus, la tréhalosémie reste constamment inférieure à la valeur initiale. Le propranolol est donc également anti-octopaminergique, ce qui confirme l'action de type "partiellement β " de l'octopamine.

D- Propranolol + glucagon

Les doses utilisées sont de 400 ng par Abeille pour le glucagon et 1,5 nmole par Abeille pour le propranolol. (100 Abeilles - P = 121,4 ± 1,9 mg)

tableau 18 - Action du propranolol sur les effets hyper glycémiants du glucagon. (entre parenthèses : injection de glucagon seul) - (résultats incomplets)

TEMPS	0	10mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
Tréhalosémie mM	[43,1]	43,1	41,2	25,3	25,4	43,4
	-	(45,3)	(42,2)	(31,9)	(51,9)	(23,2)
Glucosémie mM	8,5	10,5	10,7	7,8	8,0	9,5
	-	(11,8)	(9,8)	(8,4)	(11,6)	(7,6)
Phospho lipides *	1,24	1,2	1,3	1,0	1,4	1,5
	-	(1,0)	(1,8)	(1,0)	(0,8)	(1,6)
Stéroïdes	23,0	21,0	26,0	9,4	17,0	24,8
	-	(12,0)	(29,6)	(4,1)	(0,3)	(20,4)
Diglycérides 1-2	15,4	11,9	15,4	0,6	10,9	19,2
	-	(0,6)	(17,3)	(1,4)	(0,85)	(13,6)
Diglycérides 1-3	10,3	6,7	6,9	10,3	10,3	9,6
	-	(5,3)	(12,2)	(4,4)	(18,2)	(8,9)

* Lipides : unités arbitraires

Les glucides subissent une augmentation au temps 2H 15 après injections : cette réaction est neutralisée par le propranolol. Ceci tendrait à montrer soit que le glucagon agit en déclanchant un signal de libération d'un adrénergique, soit que le propranolol peut également inhiber les récepteurs peptidergiques "G", soit, enfin, qu'il inhibe directement l'adénylate-cylase.

IV-8 ACTION DE L'ADRENOCHROME

Les travaux réalisés en collaboration avec le Dr KRUK (Institut de Physique, Université de SZCZECIN) ont permis de montrer que l'oxydation spontanée de l'adrénaline en solution dans l'eau déionisée, à pH 6,8 conduit à un dérivé instable, par une réaction radicalaire réversible, 5 à 15mn après mise en solution (fig. 19) (KRUK et BOUNIAS, 1981, Post.Fiz.Med., sous presse), puis à une phase de pseudo-équilibre asymptôtique, durant laquelle la solution reste stable de 12H à 48H sous forme d'un mélange de 75% d'adrénaline pure et 25% d'adrénochrome. Au cours d'expériences réalisées antérieurement, l' adrénochrome avait paru agir comme un inhibiteur compétitif de l'adrénaline. Nous avons maintenant éprouvé son action spécifique, par injection à l'état pur.

L'hyper glycémie adrénergique est très rapide (10mn) et d'une forte amplitude (respectivement : 400% et 300% pour le tréhalose et le glucose). Cette réaction est plus faible mais plus étalée dans le temps avec l'adrénochrome pur. Il n'y a donc pas inhibition totale, avec effets opposés, comme dans le cas du propranolol, mais effets adrénergiques atténués et prolongés, inhérents aux analogies résiduelles de structure de l'adrénaline et de l'adrénochrome. Ceci concorde avec les atténuations de réponse obtenues par injection d'adrénaline en présence d'adrénochrome. La compétition est alors rapidement en faveur de l'adrénaline, lorsque les concentrations augmentent, vraisemblablement en raison d'une plus grande affinité de celle-ci vis à vis des β récepteurs, relativement à l'affinité de l'adrénochrome (dans le premier cas : réaction courte et forte; dans le second : réaction faible mais prolongée...)

La figure 20 résume les relations de structure des effecteurs adrénergiques et de leurs antagonistes, avec les α et β récepteurs.

tableau 19 - Comparaison des effets respectifs de l'adrénochrome et de la noradrénaline sur la glycémie de l'Abeille.
(1 nmole par individu - 100 Abeilles : $\bar{P}$ = 116,0 ± 1,0 mg)
entre parenthèses : action de la noradrénaline

	0	10mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
Tréhalosémie (mM)	10,4	19,4 (39,6)	15,5 (15,7)	16,2 (6,0)	19,9 (11,4)	3,2 (11,6)
Glucosémie (mM)	2,7	5,2 (8,2)	3,1 (2,6)	5,9 (1,0)	5,5 (2,6)	1,4 (1,6)
Phospho lipides *	1,3	0,95 (1,12)	0,72 (1,33)	1,15 (0,83)	1,5 (1,0)	1,3 (1,4)
Stéroïdes	18,0	14,0 (8,4)	2,7 (10,2)	22,2 (3,1)	22,2 (7,0)	4,6 (10,2)
Diglycérides 1-2	9,7	6,8 (5,6)	0,8 (8,0)	5,6 (15,6)	11,4 (4,5)	2,6 (4,5)
Diglycérides 1-3	2,1	2,5 (1,8)	0,64 (3,7)	2,1 (2,1)	8,4 (2,5)	2,1 (2,1)

* Lipides : unités arbitraires

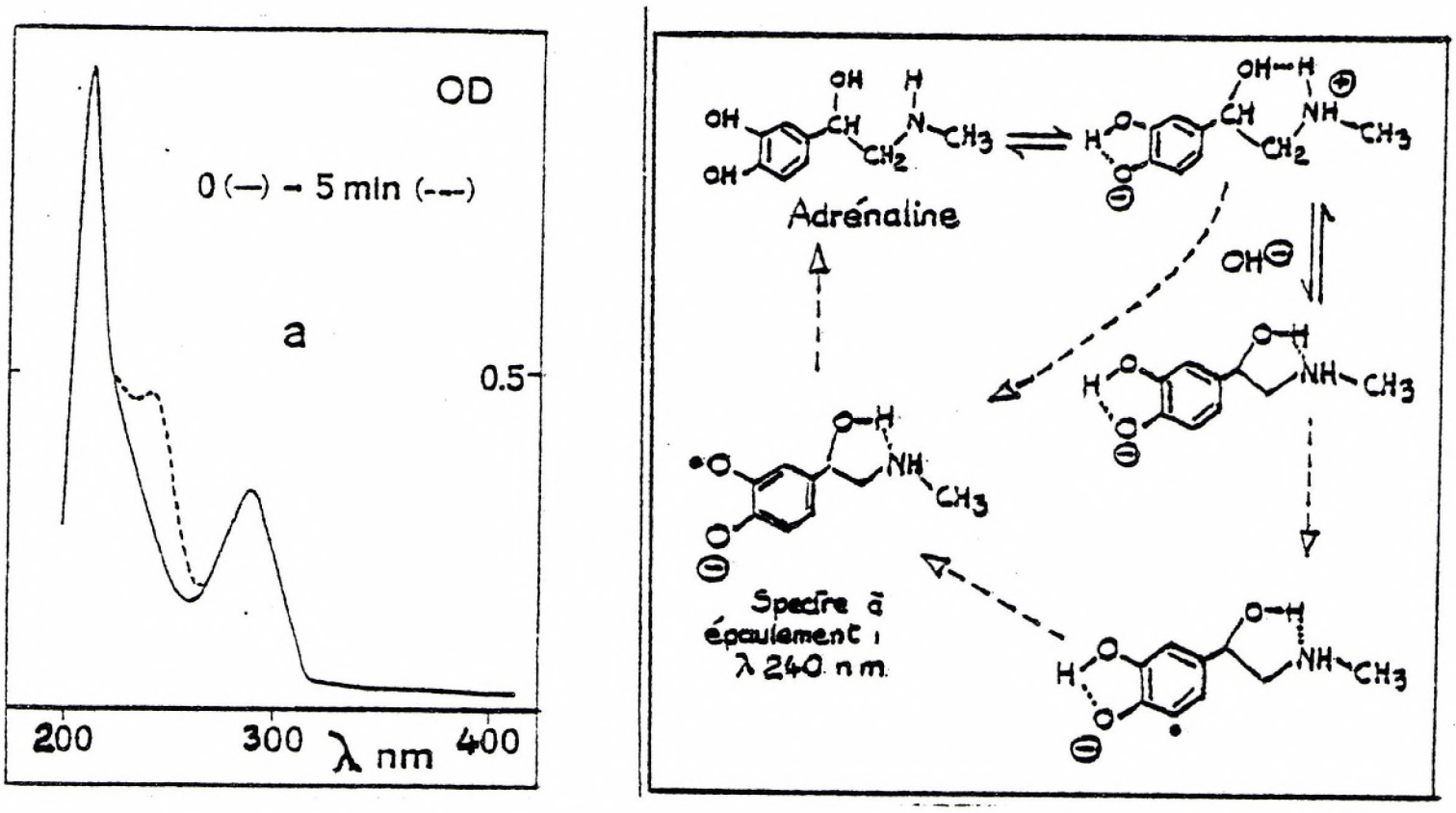


Fig. 19 - Phase réversible d'oxydation "radicalaire" de l'adrénaline. a : spectres (——) adrénaline pure. (---) dérivé "radicalaire".

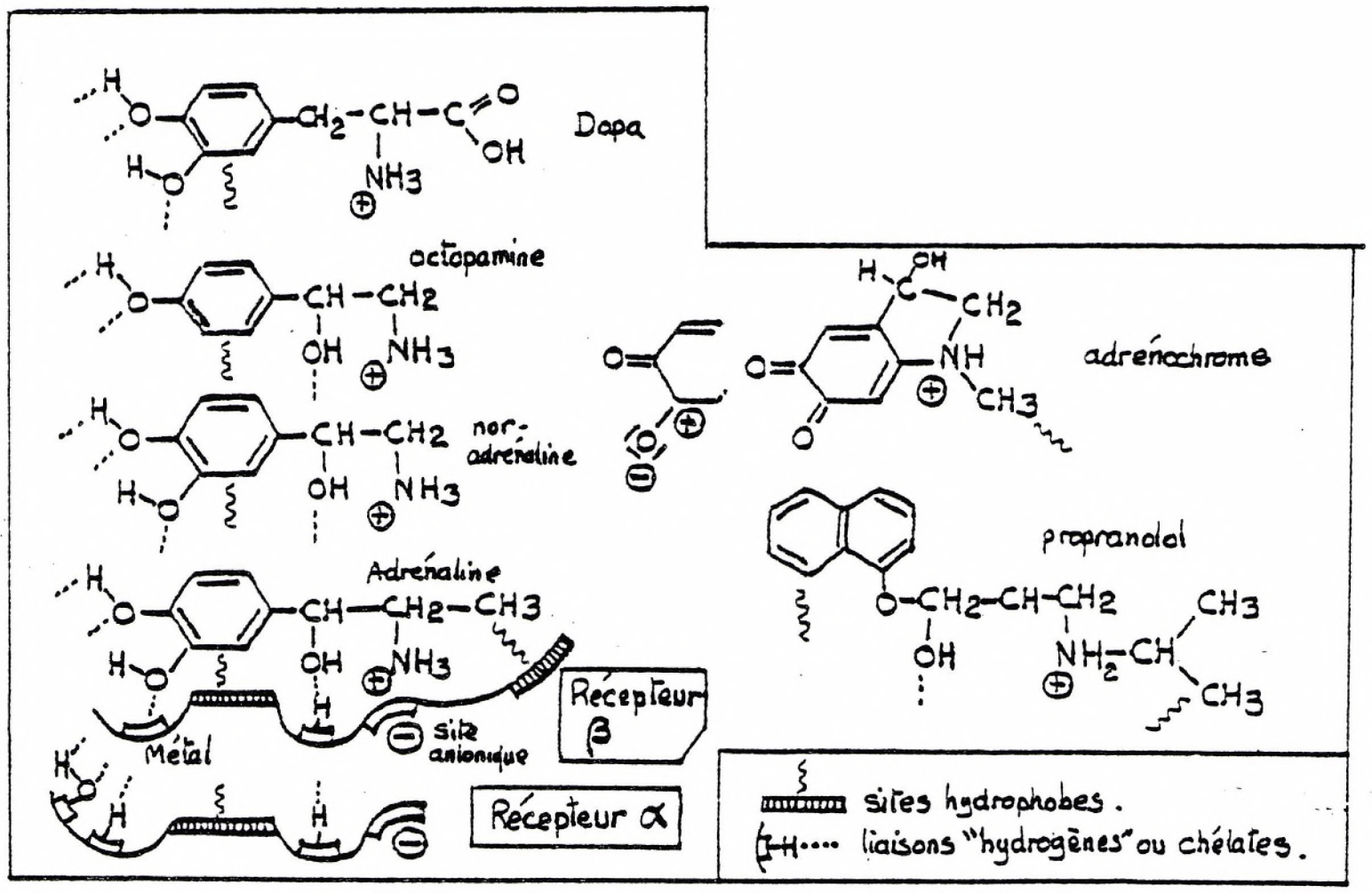


Fig. 20 - Relations de Structure entre les adrénergiques, leurs antagonistes, et les récepteurs α et β -

C.R.Ann. Trav. Lab. BC - 10, 1981, Chap. IV-9

IV-9- MECANISMES D'ACTION DE LA SOMATOSTATINE CHEZ L'ABEILLE

La somatostatine, hormone qualifiée par GUILLEMIN de "Cybernine" est un tétra-déca-peptide dont le rôle (en l'état actuel des connaissances) est de contrôler les secrétions et peut être aussi l'acte de "signal" de nombreuses hormones "neuro-peptidiques". Sa découverte chez les Vertébrés remonte à 1972 (VALE, BRAZEAU, GRANT, NUSSEY, BURGUS, RIVIER, LING et GUILLEMIN, C.R.Acad.Sc., 275D, 2913-2915); sa structure a été établie en 1973 (BURGUS, et al., 1973, Proc.Natl. Acad. SCI (USA), 70, 684-688) et sa synthèse totale réalisée en 1974 (RIVIER, J.Am.Chem.Soc., 96, 2986-2992).

Un analogue immunologique de la somatostatine a été découvert en 1979 dans l'intestin d'Abeilles (BOUNIAS et DUBOIS, 1979, C.R. Ann., 8, p.2), ce qui nous a amené à analyser le rôle de cet important effecteur sur le mode d'action des autres hormones de contrôle de la glycémie de l'Abeille, à savoir :

- des décharges endogènes provoquées par la piqüre
- de l'insuline bovine
- de l'insuline endogène d'Abeille
- du glucagon de Porc
- de la noradrénaline
- de l'octopamine
- de l'AMP cyclique

IV-9 A- INHIBITION COMPAREE PAR LES FORMES LINEAIRE ET CYCLIQUE DE LA SOMATOSTATINE, DES EFFETS HORMONAUX ENDOGENES PROVOQUES PAR L'INJECTION DE SERUM SUR LA GLYCEMIE DE L'ABEILLE

(M. BOUNIAS)

L'amplitude des modifications glycémiques provoquées par l'injection de sérum peut varier selon la saison et les lots d'Insectes.

L'expérience suivante a donc été réalisée sur un lot d'Abeilles montrant une réponse particulièrement vive au stimulus. Deux lots d'Abeilles ont été utilisés : le premier comptait 80 individus ($P = 115,7 \pm 1,1$ mg) et le second 75 individus ($P = 118,5 \pm 0,5$ mg). Les modes d'action respectifs des formes linéaire et cyclique ont été comparés, dans le but de vérifier, chez l'Insecte, l'identité d'action déjà observée chez les Vertébrés (EFFENDIC, LUFT et GUILLEMIN, 1974, Acta Endocrinologica, 77, sup.190, p.14).

Compte tenu des faibles quantités d'effecteurs purifiés dont nous disposions (500 µg de chaque forme pour l'ensemble de la campagne expérimentale), il a été possible d'injecter 75 ng de forme linéaire et 50 ng à 500 ng de forme cyclique par individu.

Les résultats numériques partiels portant sur la glycémie et sur la lipémie sont présentés dans les tableaux 19 et 20. La figure 21 illustre l'action de la somatostatine linéaire.

La somatostatine, qu'elle agisse sous forme linéaire ou cyclique, amortit de manière remarquable l'amplitude des oscillations glycémiques consécutives à l'injection de sérum.

tableau 20 - Action de la somatostatine (SStt) linéaire (50 ng /Abeille) sur les modifications de la glycémie et de la lipémie consécutives à une injection de sérum (S) chez l'Abeille. Les écarts types sont donnés entre parenthèses pour N = 3 déterminations.

TEMPS		0	5-10mn	30mn	1H	1H 30	2H	2H 30	3H
				] 45mn [					
Tre mM	SStt	36,0(3,1)	29,4(1,1)	35,6(1,6)	29,9(1,5)	39,6(2,1)	36,3(1,8)	30,9(0,5)	36,0(1,2)
	S	[36,4(3,0)]	[27,5(1,3)]	[49,2(6,7)]	[28,4(0,6)]	[9,7(9,6)]	[6,2(5,6)]	24,5(0,8)	27,7(3,0)
Glc mM	SStt	3,1(0,2)	2,0(0,1)	2,7(0,02)	2,3(0,06)	2,1(0,15)	2,3(0,17)	2,4(0,15)	1,9(0,15)
	S	3,6(1,2)	3,9(0,4)	7,8(2,5)	5,1(2,3)	2,4(0,9)	5,1(1,5)	3,7(0,02)	4,8(0,9)
PL *	SStt	2,8	1,8	2,4	2,2	1,2	1,0	0,73	0,78
	S	1,9	1,1	] 1,2 [		1,7	1,9	-	1,8
MG	SStt	0,7	0,8	1,0	0,8	0,4	1,1	1,5	0,5
AG	SStt	8,3	0,5	0,6	2,3	0,2	0,3	0,2	0,2
St	SStt	0,25	0,11	0,22	0,20	0,11	0,07	0,06	0,08
	S	0,2	0,11	] 0,15 [		0,16	0,16	-	0,11
DG 1-2	SStt	179,0	115,0	179,0	140,0	51,0	42,7	16,6	30,9
	S	11,0	7,5	] 9,6 [		18,0	14,0	-	14,0
DG 1-3	SStt	2,3	1,1	3,9	1,7	1,6	1,0	0,9	0,5
	S	3,4	2,1	] 5,9 [		8,0	5,0	-	6,0
TG	SStt	2,9	0,91	1,1	1,4	~1,0	~1,1	~0,4	~0,7
EAG	SStt	8,9	2,9	13,0	6,9	~8,0	~8,0	~13,0	~18,0

Tre = tréhalose - Glc = glucose - PL = phospho lipides - MG = mono-glycérides - DG = di-glycérides
AG = acides gras - TG = tri-glycérides - St = stérofdes - EAG = esters d'acides gras.

*Lipides : unités arbitraires

tableau 21 - Action de l'injection de somatostatine cyclique (SStt) (50 et 500 ng par Abeille) sur la glycémie et la lipémie de l'Abeille. S = injection de sérum
mêmes symboles que sur le tableau 20.
résultats incomplets

TEMPS :		0	5-10mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
Tre	SStt 50	31	12,3	22,8	23,8	27,1	13,7
	SStt 500		27,8	18,3	23,4	18,1	27,2
	S	26,9	50,2	29,2	26,5	15,9	26,1
Glc	SStt 50	3,25	1,7	3,8	3,0	3,9	2,5
	SStt 500		2,7	2,8	3,3	3,0	2,6
	S	7,9	14,1	8,3	6,1	7,8	7,9
PL *	SStt 50	1,0	0,74	0,74	0,89	0,60	0,30
MG	SStt 50	0,27	0,85	0,09	0,25	0,41	0,41
AG	SStt 50	31,9	0,54	3,7	0,7	0,45	0,45
St	SStt 50	36	22	43,6	69	46	25
DG 1-2	SStt 50	10,0	3,6	34	19	10,3	5,6
DG 1-3	SStt 50	0,002	0,008	0,76	0,57	0,13	0,11
TG	SStt 50	0,73	0,015	0,11	0,08	0,011	0,017
EAG	SStt 50	2,4	0,23	2,7	1,9	5,4	2,7

* Lipides : unités arbitraires

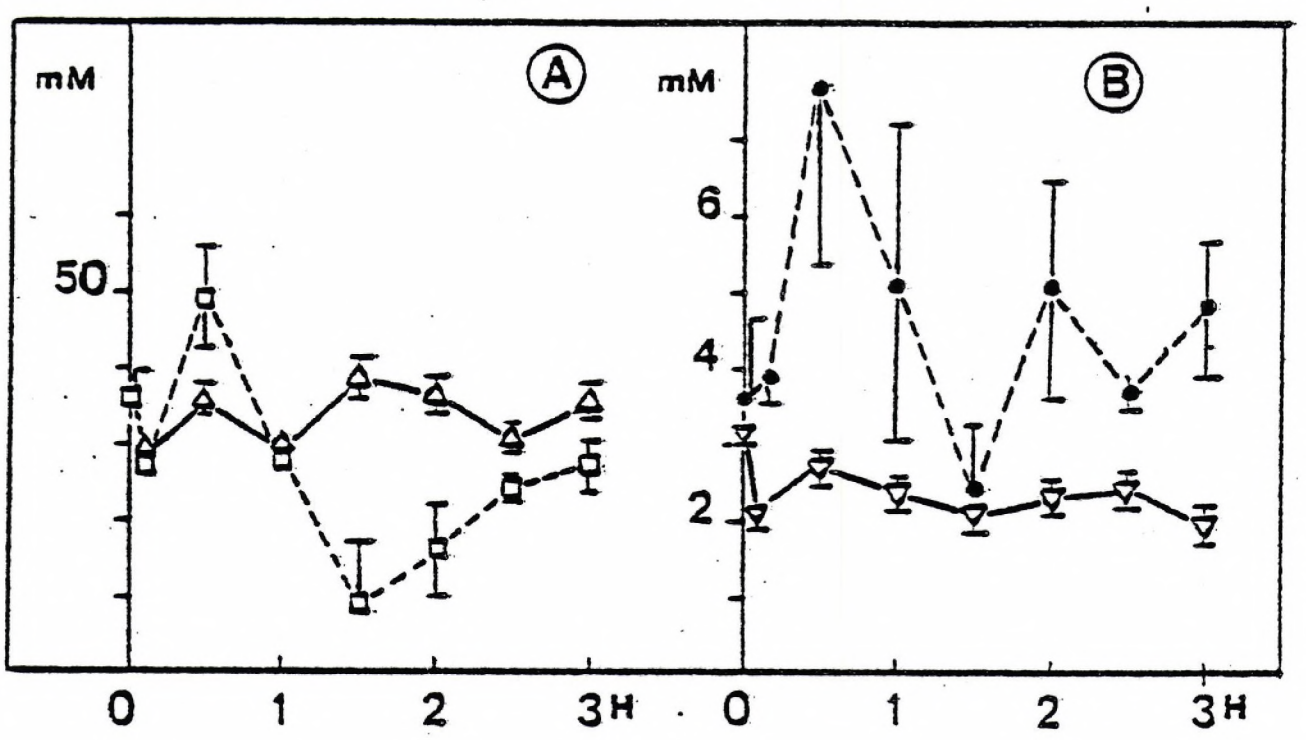


Fig. 21 : Ⓐ Tréhalosémie Ⓑ Glucosémie -
(□---□) : sérum ; (Δ—Δ) : + somatostatine linéaire

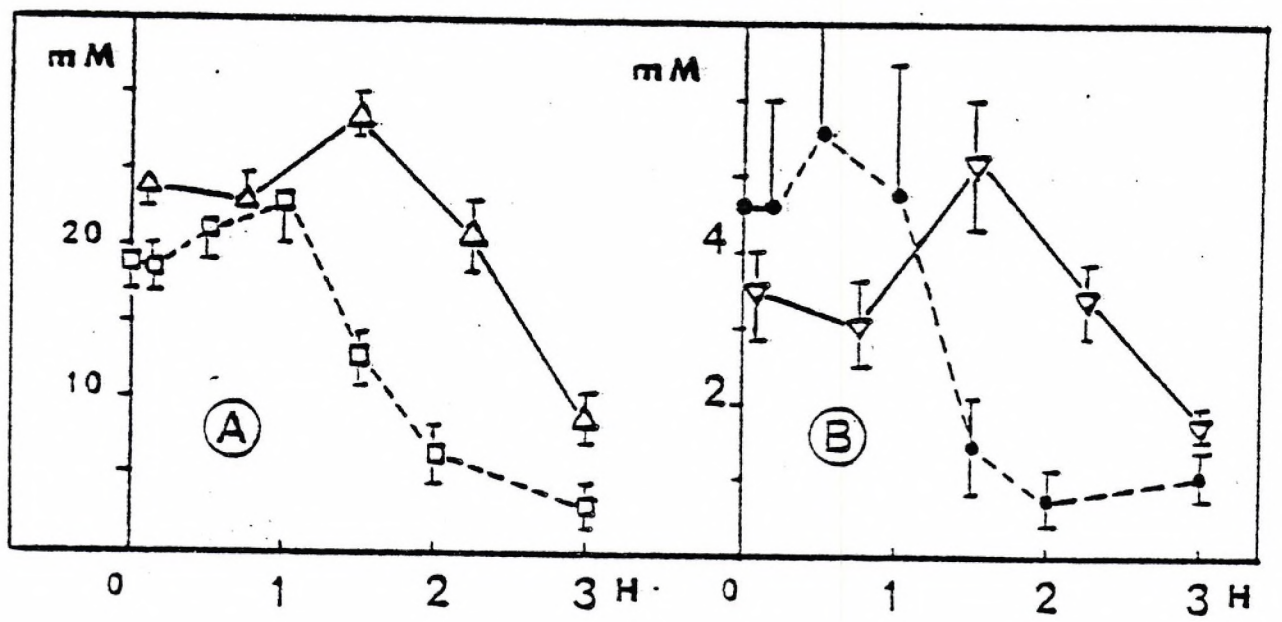


Fig. 22 - Ⓐ Tréhalosémie Ⓑ Glucosémie
(□---□) : Insuline Bovine
(Δ—Δ) : Insuline + Somatostatine linéaire

IV-9 B- NEUTRALLSATION PAR LA SOMATOSTATINE DES EFFETS DE L'INSULINE BOVINE CHEZ L'ABEILLE

Au cours de cette série d'épreuves, la somato-statine et l'insuline ont été employées à concentrations équimolaires (10 nmoles par Abeille).

L'injection d'insuline seule provoque une chute de glycémie très significative à partir de 1H 30 après injection (Tréhalose : Q = 0,014; Glucose : Q = 0,005). L'adjonction de somatostatine se traduit par un retard assez important de la réaction hypoglycémique, la glycémie n'étant pas significativement affectée 2H 15 après injections. Au bout de 3H, les glucosémies sont comparables dans les deux cas (Q = 0,172) tandis que la tréhalosémie se maintient à un niveau significativement plus élevé en présence de somatstatine qu'avec l'insuline seule (Q = 0,024).

Ces résultats sont illustrés par la figure 22 (les fig. 21 et 22 sont extraites de : BOUNIAS et DUBOIS, C.R.Acad.Sc., 1982 - sous presse).

Le tableau 21 regroupe les principales données numériques acquises au stade actuel du dépouillement des travaux.

Chez les lipides, les classes les plus importantes montrent également une très bonne stabilité de 45mn à 3H après injection.

tableau 22 - Action de la somato-statine (SStt) sur les effets de l'insuline bovine chez l'Abeille (i = insuline seule). Les écarts types sont donnés entre parenthèses pour N = 4 déterminations

		5mn	30mn	] 45mn [1H	1H 30	2H / 2H 15	3H
Tre mM	SStt	24,6(0,04)	]22,7(2,0)[		28,8(0,7)	20,7(2,3)	8,8(1,4)
	i	18,8(1,3)	21,4(1,9)	23,1(3,6)	12,7(1,7)	6,4(1,7)	3,2(1,5)
Glc mM	SStt	3,4(0,6)	]3,0(0,6)[		5,2(0,9)	3,3(0,5)	1,7(0,2)
	i	4,6(1,5)	5,6(2,8)	4,9(1,8)	1,5(0,6)	0,8(0,4)	1,1(0,3)
LIPIDES : résultats provisoires exprimés en hauteurs de pics (mm).							
Phospho lipides		31	19,5		19	18	23
Monglycérides		1	1,5		0,8	1	2
Ac. gras C18		2	1,5		0,8	1,5	2
Stéroïdes libres		18	5,7		4,5	7,0	8,5
Diglycérides 1-2 (~ 18)		2,5	2,5		1,5	1,5	1,5
Triglycérides	< C16	10	11		11,5	11	10
	" C18	3,5	3,5		3	2,5	3,5
Esters d'ac. gras		2,8	2		1,5	1	1,5
Esters de stéroïdes		8,5	8		8,5	8	7

IV-9 C- ACTION DE LA SOMATOSTATINE* SUR LES EFFETS DE L'INSULINE ENDOGENE ** D'ABEILLE

(*) M. BOUNIAS

(**) M. BOUNIAS, L. GOURDOUX et R. MOREAU

Les expériences ont été réalisées sur un lot de 80 Abeilles d'un poids moyen individuel P = 121,6 ± 2,5 mg.

Les résultats numériques partiels sont indiqués dans le tableau 23.

tableau 23 - Evolution de la glycémie et de la lipémie de l'Abeille après injection d'insuline endogène (0,5 µU/Ab) en présence de somatostatine cyclique (10 ng/Ab)
Ecarts types entre parenthèses / N = 3

	0	5-10mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
Tréhalose mM	24,2(16,4)	25,8	25,8	17,3	36,3	23,1
Glucose mM	5,0(3,3)	4,96	4,5	3,1	6,4	4,1
Phospho lipides *	5,2	4,5	4,1	2,8	6,7	4,5
Monoglycérides*	4,5	5,8	4,5	2,5	2,5	6,7
Acides gras*	1,5	1,6	1,6	1,1	1,4	1,8
	1,3	1,1	0,9	1,0	0,5	0,6
Stéroïdes *	12	5,7	4,5	3,4	8,2	5,7
Diglycérides 1-2*	4,2	1,6	1,4	0,8	3,1	1,4
Diglycérides 1-3*	1,4	0,5	0,4	0,2	0,5	0,45

* unités arbitraires

La somatostatine neutralise remarquablement bien les effets hypoglycémiques de l'insuline : il ne subsiste qu'une seule oscillation de 1H 30 à 2H 15.

Les lipides sont également stabilisés, quoiqu'ils accusent une baisse sensible au niveau des stéroïdes et des diglycérides.

IV-9 D- ACTION DE LA SOMATOSTATINE SUR LES EFFETS DU GLUCAGON DE VERTEBRES CHEZ L'ABEILLE

M. BOUNIAS

La somatostatine linéaire et le glucagon ont été injectés en mélange à concentrations égales : 50 ng par Abeille. Les lots d'Insectes comprennent 80 Abeilles d'un poids moyen individuel P = 122,5 ± 2,2 mg.

Les résultats provisoires sont indiqués dans le tableau 24.

Assez curieusement, la somatostatine linéaire ajoutée au glucagon montre, par injection, une tendance hypo-glycémique et hypo-lipémique, comme s'il ne pouvait se manifester que des effets de type insulinique endogènes (induits par la présence du glucagon) non neutralisés...

tableau 24 - Action de l'injection simultanée de somatostatine et de glucagon sur la glycémie (mM) et la lipémie (hauteurs de pics) de l'Abeille.

	0	5-10mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
Tréhalose mM	36,4	14,5	30,4	9,6	14,9	5,9
Glucose mM	6,5	4,4	5,7	3,6	4,6	2,7
LIPIDES (hauteurs de pics - Données provisoires)						
Phospho lipides	49,0	27,5	26,0	12,5	26,5	33,5
Monoglycérides	6,0	1,5	2,0	2,0	2,5	4,5
Acides gras C16	2,8	2,0	2,2	3,8	2,5	4,6
C18	3,0	3,0	2,0	4,5	2,0	5,5
C24	3,2	2,8	1,8	4,5	2,6	3,2
Stéroïdes	43,0	13,5	14,5	15,0	11,5	23,0
Diglycérides 1-2	16,0	3,5	3,6	7,0	2,0	7,8
Diglycérides 1-3	8,0	3,5	4,5	7,5	3,5	7,6
Triglycérides < C16	17,0	10,5	12,5	13,0	11,0	13,5
~ C18	6,0	2,0	4,5	3,5	1,5	4,5

IV-9 E- ACTION DE LA SOMATOSTATINE SUR LES EFFETS ADRENERGIQUES CHEZ L'ABEILLE

M. BOUNIAS

Au cours de cette série expérimentale, l'influence de la somatostatine cyclique (200 ng/Ab) sur les effets respectifs de la noradrénaline et de l'octopamine (1 nmole/Ab) a été analysée au niveau de la glycémie et de la lipémie. L'ensemble des échantillons d'Abeilles comportait 180 individus d'un poids moyen $P = 123,0 \pm 2,5$ mg.

tableau 25 - Action de l'injection simultanée de noradrénaline et de somatostatine sur la glycémie et la lipémie de l'Abeille.

	0	5-10mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
Tréhalose mM	15,3	21,8	40,8	28,1	11,7	43,2
Glucose mM	2,7	2,98	4,8	3,66	3,8	4,1
LIPIDES (Unités arbitraires)						
Phospho lipides	1,8	3,6	4,1	3,5	2,0	5,7
Monoglycérides ($.10^{-3}$)	6,9	2,2	6,9	2,6	4,6	7,9
Ac.gras ($.10^{-3}$) "courts"	10,8	1,6	0,6	2,1	2,8	1,0
"longs"	1,2	0,14	0,12	0,5	0,1	0,3
Stéroïdes ($.10^{-3}$)	11,6	13,3	13,9	11,4	4,1	26,9
Diglycérides 1-2 ($.10^{-3}$)	20,8	25,0	29,0	19,6	11,5	41,8
Diglycérides 1-3 ($.10^{-3}$)	1,4	4,0	3,3	3,7	1,8	3,7
Triglycérides ($.10^{-3}$)	6,7	17,5	10,1	13,5	8,8	7,7
Esters de stéroïdes ($.10^{-3}$)	0,07	0,02	0,02	0,02	0,003	0,003

L'action hyperglycémiante de la noradrénaline n'est quantitativement affectée par la somatostatine ni au niveau des glucides (+ 180 à 270% en 45mn) ni au niveau des lipides parmi lesquels les phospho-lipides, les di et triglycérides augmentent au détriment des acides gras, tandis que le maximum de concentration des stéroïdes coïncide avec celui des glucides.

tableau 26 - Action de l'injection simultanée de somatostatine et d'octopamine sur la glycémie et la lipémie de l'Abeille.

	0	10mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
Tréhalose mM	37,5	29,0	29,6	29,1	21,9	25,9
Glucose mM	6,4	11,6	12,5	8,6	6,5	6,7
LIPIDES (Unités arbitraires)						
Phospho lipides	2,7	1,0	1,7	0,8	1,3	3,1
Stéroïdes ($.10^{-3}$)	35,0	12,0	20,0	77,0	12,9	29,0
Diglycérides 1-2 ($.10^{-3}$)	22	7	13	4	9	20
Diglycérides 1-3 ($.10^{-3}$)	3,3	1,8	2,9	0,86	1,0	2,4

L'hyperglucosémie spécifique (non accompagnée d'hypertréhalosémie) qui caractérise l'effet de l'octopamine se reproduit en dépit de la présence de somatostatine. Le maximum intervient ici 15mn plus tôt que dans le cas de l'octopamine pure : cela tient soit à la variabilité de réponse inhérente à la différence d'époque de prélèment des échantillons (1 mois d'écart), soit à un effet anti-hypoglycémique de la somatostatine, par inhibition de la sécrétion d'insuline endogène, par exemple.

Les autres facteurs ne présentent pas de variations actuellement interprétables.

En conclusion, il semble maintenant assuré que la somatostatine neutralise les effets peptidergiques mais non les effets adrénergiques : ces deux actions se manifestent au niveau de récepteurs distincts, comme le laissait supposer leurs profondes divergences de structure (quoique des résidus tyrosine ou phényl-alanine en position de "site actif" auraient pu contribuer à un signal de type β , mais affaibli, comme celui de l'octopamine ou de la Dopa...).

Il reste maintenant à vérifier l'action de la somatostatine au niveau du 1er messager induit par les signaux hyperglycémiques de toutes natures : l'AMP cyclique.

IV-9 F- ETUDE DE L'INTERACTION : SOMATOSTATINE / AMP CYCLIQUE

M. BOUNIAS

Les Abeilles constituent, ici, un échantillon de 100 individus d'un poids moyen P = 124,5 ± 2,2 mg.

L'AMP cyclique est mis en solution sous forme de dibutyrate à la dose dite "0,5" (132 ng/Ab) en présence de somatostatine cyclique à une concentration correspondant à 360 ng/Ab.

Le tableau 27 résume les résultats obtenus au stade actuel du dépouillement des enregistrements photométriques.

		0	10mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
Tréhalose	mM	37,4	41,6	53,9	18,6	28,3	16,1
Glucose	mM	6,4	10,5	18,4	14,9	10,7	6,5
LIPIDES (Unités arbitraires)							
Phospho lipides		2,6	1,4	1,1	0,8	1,0	1,1
Stéroïdes ($.10^{-3}$)		35,0	16,0	8,2	3,0	13,7	3,7
Diglycérides 1-2 ($.10^{-3}$)		22,0	12,0	7,0	2,7	6,9	2,7
Diglycérides 1-3 ($.10^{-3}$)		33,0	27,0	15,0	7,6	12,6	5,7

L'hyper-glycémie AMP cyclique-dépendante n'est pas affectée par la présence de somatostatine : l'action du type "Cybernine" est donc limitée au niveau du signal hormonal : elle cesse d'intervenir dès lors que la première conséquence du signal s'est manifestée en mettant en marche le processus de la glycogénolyse. Les lipémies oscillent à un niveau inférieur à celui des témoins.

V - INTERACTION β BLOQUANT / PEPTIDERGIQUE

Les résultats précédents plaident en faveur d'une certaine indépendance de cible des hormones hyperglycémiantes respectivement de type adrénergique et peptidergique. Il restait à vérifier, dans cette optique, si les effets du glucagon pouvaient être affectés par un β bloquant. A partir d'un échantillon de 100 Ab d'un poids moyen individuel P = 121,4 ± 1,9 mg, nous avons injecté simultanément, par Abeille : 400 ng de glucagon et 444 ng de propranolol (soit 1,5 nmole).

tableau 28 - Action de l'injection simultanée de glucagon et de propranolol sur la glycémie et la lipémie de l'Abeille. (Voir glucagon seul : tableau 18)

		0	10mn	45mn	1H 30	2H 15	3H
Tréhalose	mM	32,1	43,2	41,2	25,3	25,4	43,5
Glucose	mM	6,6	10,5	10,7	7,8	8,0	9,5
LIPIDES (Unités arbitraires)							
Phospho lipides		1,2	1,2	1,3	1,0	1,4	1,6
Stéroïdes ($.10^{-3}$)		23,0	21,0	26,0	9,4	17,0	25,0
Diglycérides 1-2 ($.10^{-3}$)		15,4	11,9	15,4	5,9	10,9	19,2
Diglycérides 1-3 ($.10^{-4}$)		1,0	0,7	0,7	1,0	1,0	0,96

Tandis que les lipides oscillent autour de la valeur initiale, la glucosémie montre une augmentation sensible maintenue au bout de 3H et la tréhalosémie une augmentation plus rapide (5-10mn) mais de moindre durée : ces deux effets sont caractéristiques de l'action du glucagon (cf.C.R.Acad.Sc., 1979, 289 D, 201-204) et ne sont donc pas altérés par le propranolol. Le glucagon n'agit donc pas directement sur les récepteurs β .

Une rapide synthèse de l'ensemble des résultats précédents permet d'émettre l'hypothèse illustrée par la figure 23 quant aux interactions hormonales dans le contrôle de la glycémie de l'Abeille.

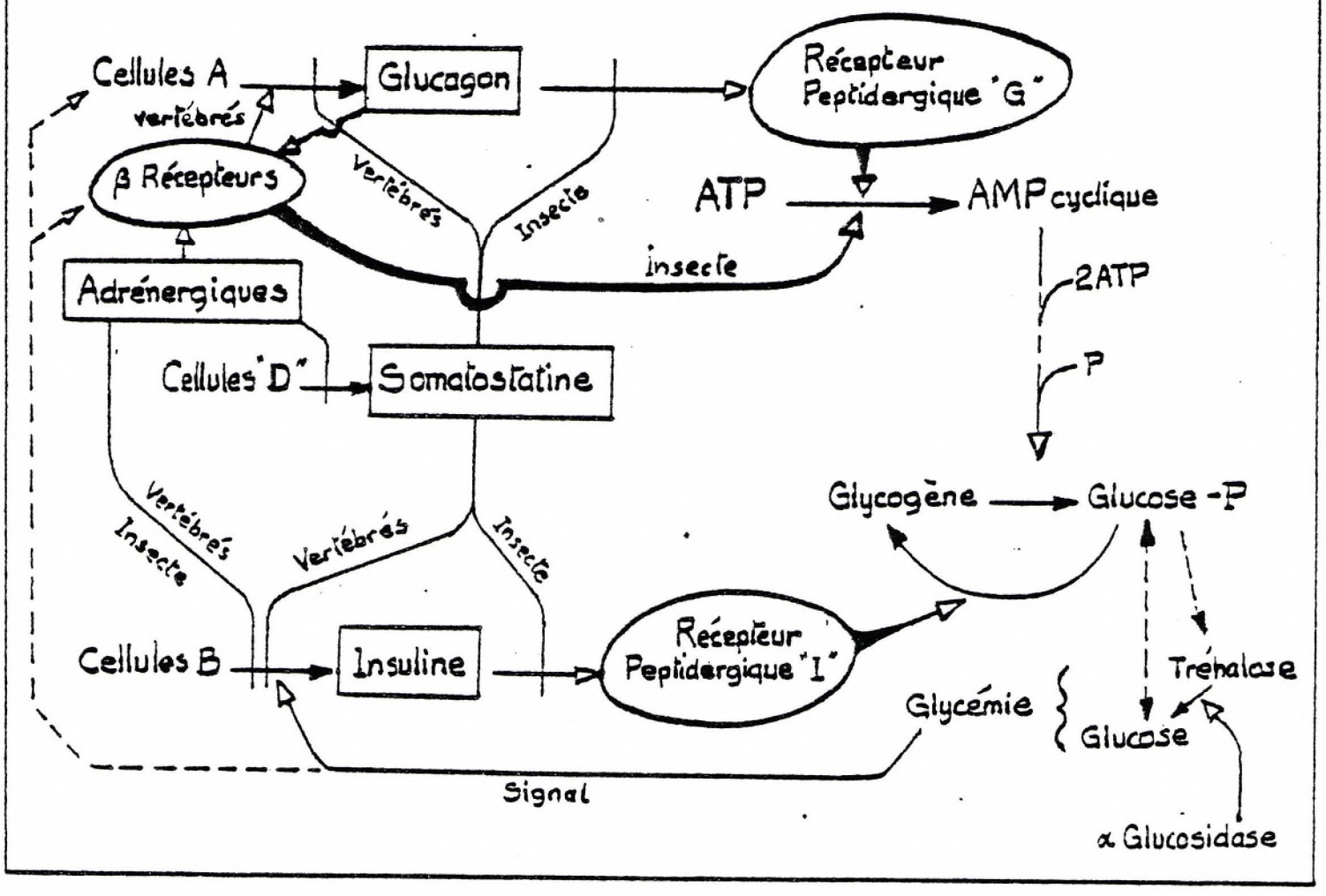


Fig. 23 Interactions hormonales dans le contrôle de la glycémie

Réactions métaboliques : ⟶
Signaux : ⇢
Inhibitions : ⟶|

VI - PATHOLOGIE BIOCHIMIQUE :

ALTERATION DE LA GLYCEMIE DU MOUSTIQUE AEDES AEGYPTI SOUS L'ACTION DE LA TOXINE DU BACILLUS THURINGIENSIS

M. BOUNIAS, C. VIVARES et Mlle BOULBES

L'emploi de toxines microbiennes dans la lutte contre les Moustiques est étudié à Montpellier, conjointement par l'INRA (Station de Cyto-pathologie) et l'Université.

La collaboration du LBC a été sollicitée pour la mise au point de l'analyse des glucides chez le Moustique pris individuellement, puis l'extension des recherches à l'étude de la glycémie d'Orthoptères.

Les travaux entrepris en commun ont été malheureusement interrompus par suite des circonstances. Une technique de prélèvement direct en micro-seringue de capacité totale 1 µl permet d'obtenir 0,3 à 0,5 µl par larve L3. Les dépôts sur plaques sont de 0,1 à 0,2 µl. Il n'est pas indispensable d'éliminer auparavant les protéines.

La comparaison des larves Témoins, anesthésiées par $MgCl_2$ et intoxiquées par l'extrait "BTI" est illustrée par la figure 24.

Les larves contiennent du tréhalose et du glucose, ainsi qu'un troisième composant important dont la littérature donne à penser qu'il pourrait s'agir de l'acide glucuronique. C'est ce dernier composant qui se retrouve le plus altéré par l'action de $MgCl_2$ et la toxine, dont les conséquences sont également perceptibles sous forme d'un accroissement du rapport Tréhalose/Glucose. Il serait, dès lors, intéressant de vérifier si ce dernier point peut être mis en relation avec une inhibition de l'activité α-glucosidasique : certaines bactéries secrêtent en effet de puissants inhibiteurs des osidases, ce qui nous amène au chapitre suivant.

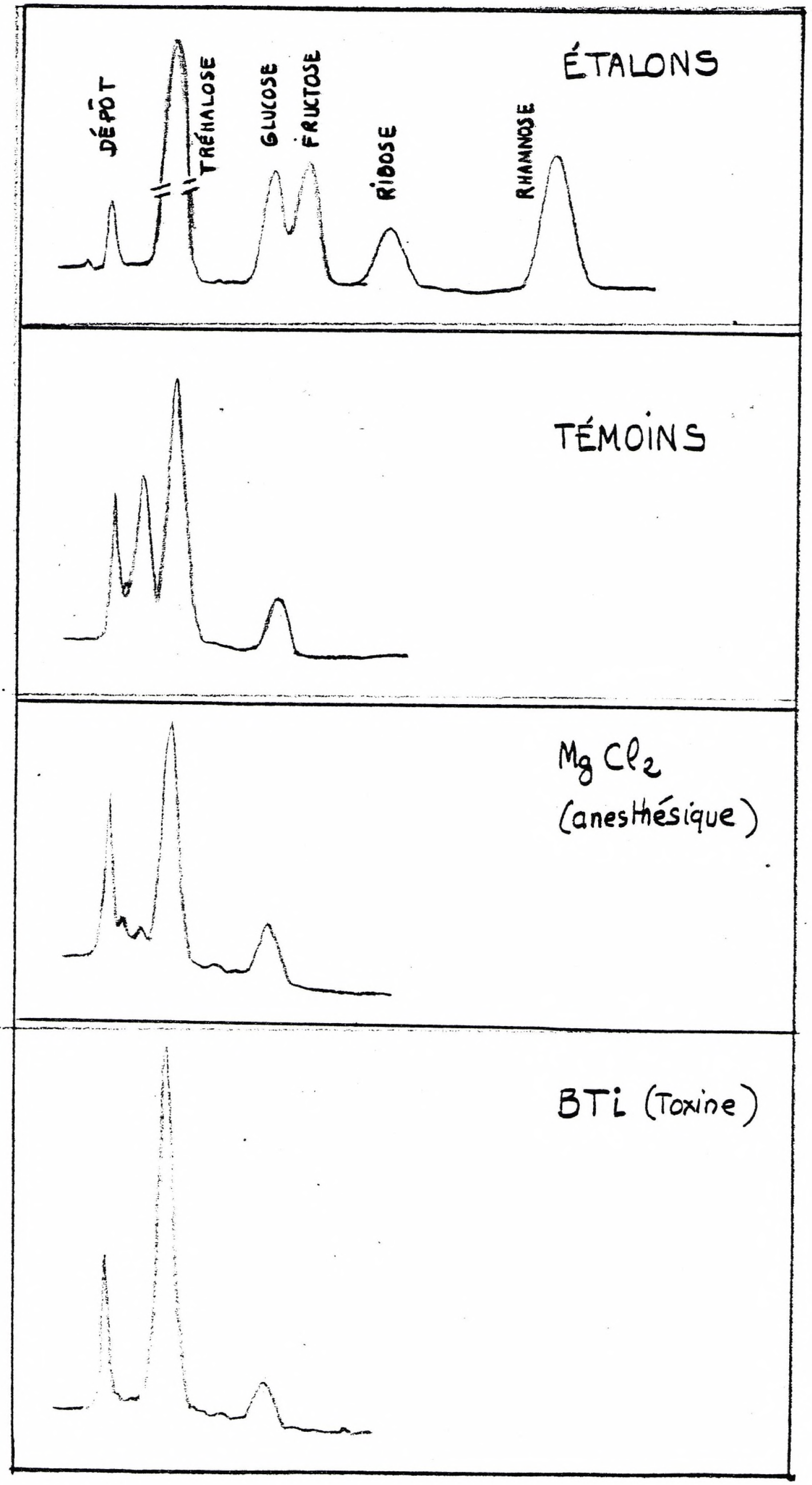


Fig. 24 . Action de $MgCl_2$ et de la Toxine "BTi" sur la glycémie individuelle de Aedes aegypti

C.R.Ann. Trav. Lab. BC, 10, 1981 - Chap. VII

VII - ETUDE SUR LES α-GLUCOSIDASES D'ABEILLES DU MECANISME MOLECULAIRE D'ACTION D'INHIBITEURS THERAPEUTIQUES DESTINES A LA LUTTE CONTRE LES DIABETES

Trois substances actuellement étudiées en expérimentation clinique par les Instituts de Pharmacologie et de Recherches Cliniques BAYER, de Wuppertal ont été récemment extraites de micro organismes, à savoir : BAYe 4609 et BAYg 5421 (Acarbose) : chez des Actinomycètes (SCHMIDT et al., 1977, Naturwissenschaften 64, S.535) et BAYn 5595 (Désoxynojirimycine) chez diverses souches de Bacillus (SCHMIDT et al., 1979, Naturwiss., 66, S.584).

Leur formules respectives sont précisées sur la figure 25. Les mécanismes cinétiques respectifs d'action de ces 3 composés sur les α-glucosidases de l'Abeille sont illustrés par les figures 26 à 28, et les valeurs numériques des paramètres qui en découlent sont rassemblées dans les tableaux 29 à 31.

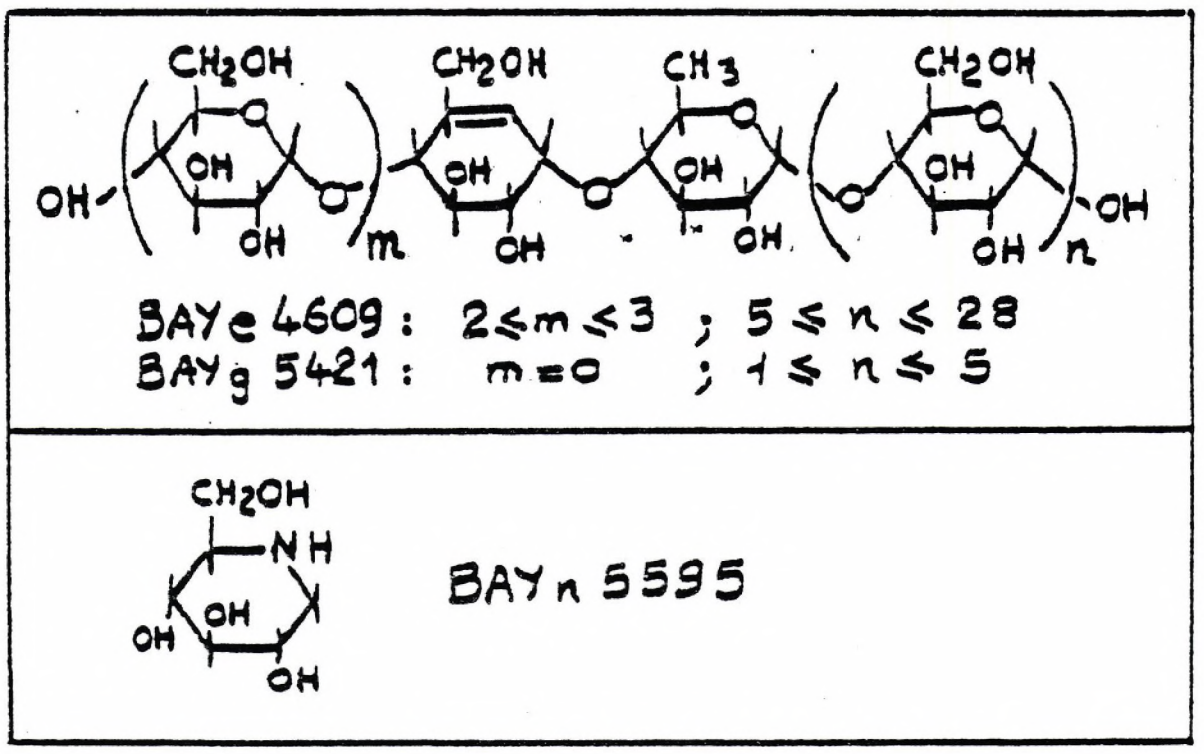


Fig. 25. Structure des inhibiteurs thérapeutiques anti-diabétiques expérimentés.

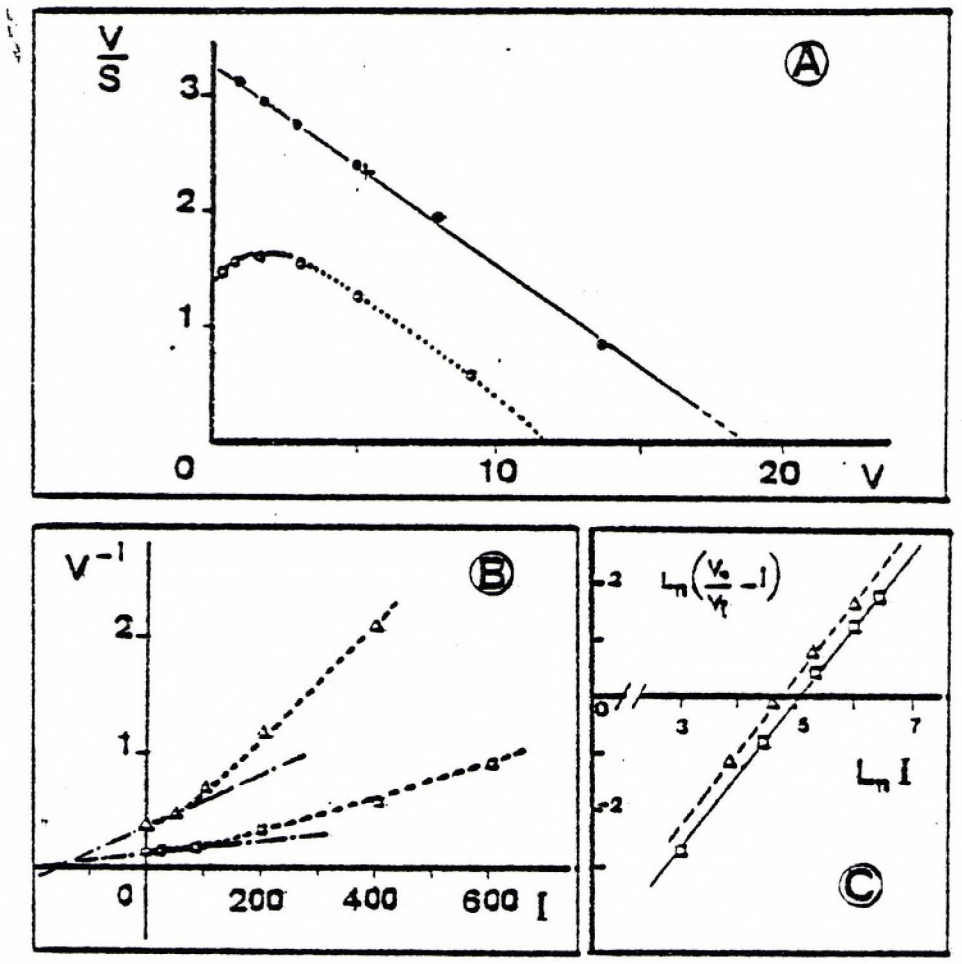


Fig. 26 - Mécanisme d'action du BAYe 4609 sur les α-glucosidases de l'hémo-lymphe d'Abeilles (cf. tableau 29)

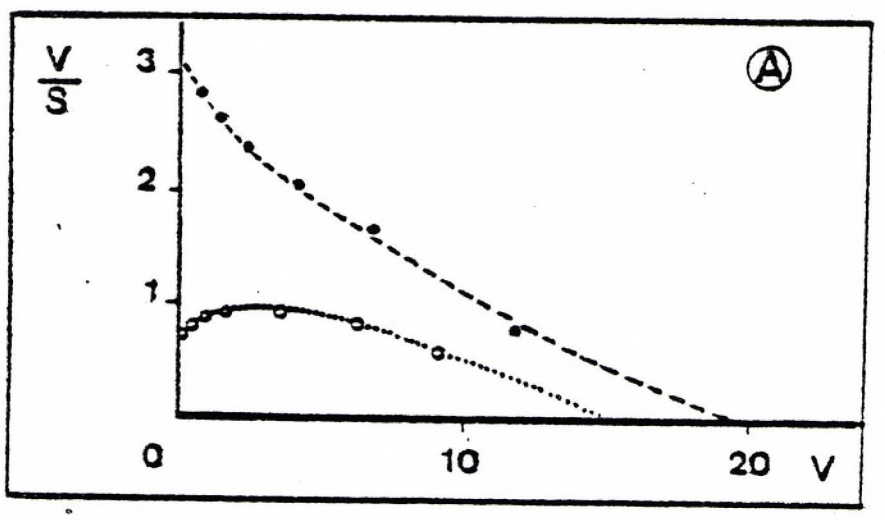
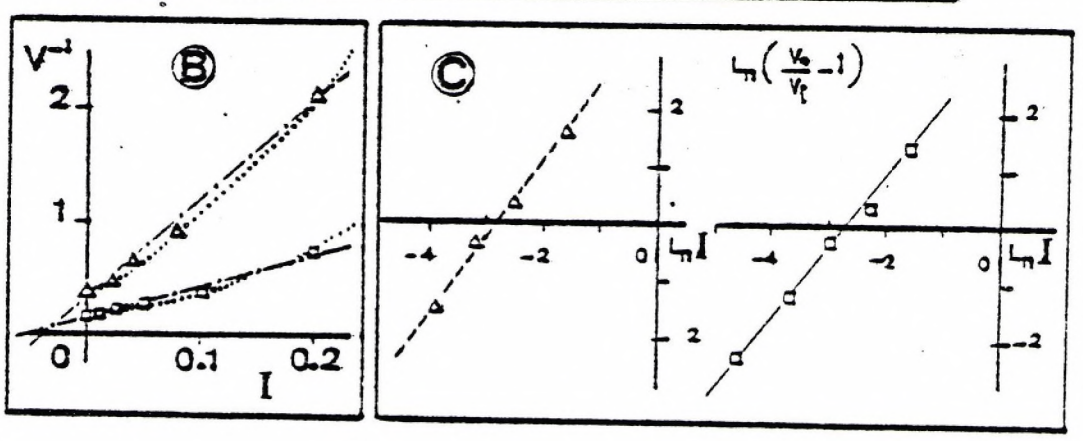


Fig. 27 - Mécanisme d'action du BAY g 5421 (cf. tableau 30)



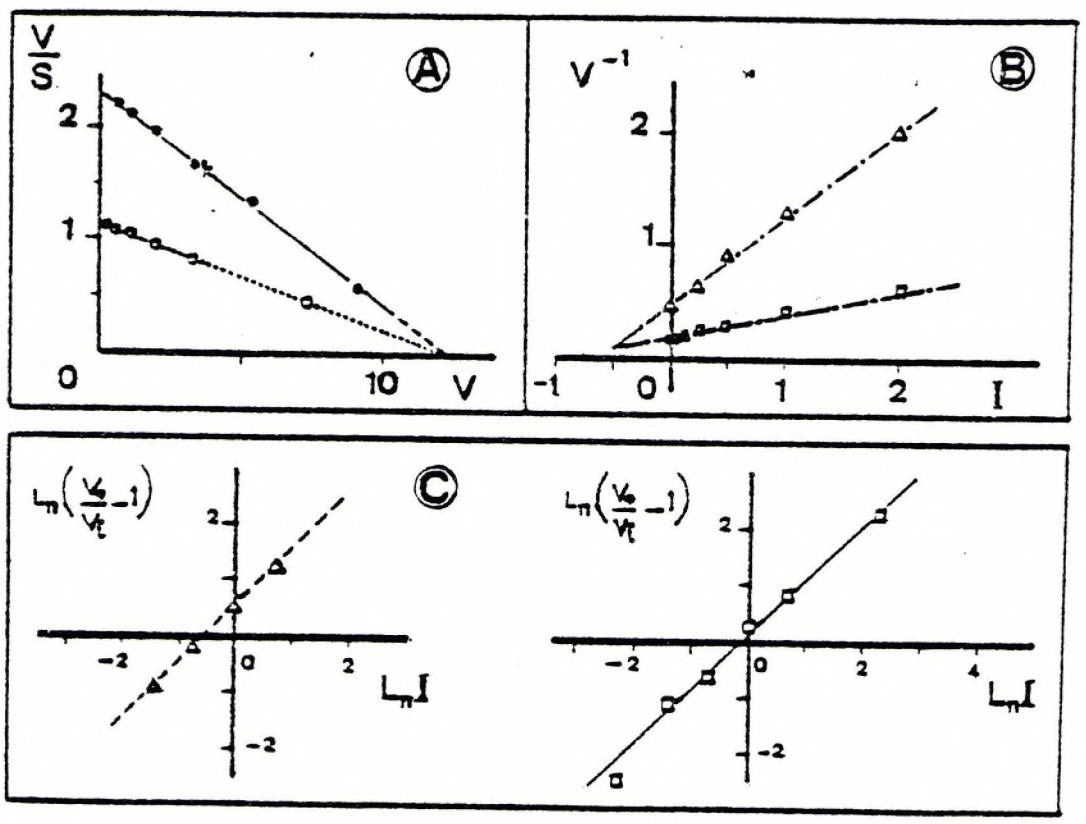


Fig. 28 - Mécanisme d'action du BAYn 5595 (cf. tableau 31)

Fig. 26-27-28 :

Ⓐ forme d'Augustinsson
Ⓑ forme de Dixon
Ⓒ forme de Chou

Table 29- Kinetics data for the inhibition of Honeybees α - glucosidases by BAY e 4609. The S. E. M. are indicated between parenthesis after N determinations.

	V_M ($\mu M.min^{-1}$ μl^{-1})	K or Km (mM)	V_M/K or V/K_m	n
controls (N = 5)	20.3 (2.4)	6.37(0.89)	3.187	1.01 (0.004)
Inhibition (N = 5) $I = 133.5\ \mu M$	11.7 (1.5)	6.26 (0.96)	1.867	1.17 (0.04)
f_i	1.735	0.982	1.707	1.16
K'_i $\mu g/g$	136.05	-	-	-
K'_i μM	181.6			
K_i $\mu g/g$			141.4	
K_i μM	-	-	188.2	-

$K'_i/K_i = 0.962 \simeq 1$

Table 30- Kinetic parameters of the Honeybee α-glucosidase inhibition by BAY g 5421. The S. E. M. are given between parenthesis after N determinations.

	V_M ($\mu M.min^{-1}.\mu l^{-1}$)	K or K_m (mM)	V_M/K or $/K_m$	n
Controls (N = 5)	20.7 (3.0)	7.74 (1.28)	2.67	0.95 (0.05)
Inhibition (N = 6) I = 0.3 μM	15.2 (1.9)	16.7 (2.3)	0.91	1.19 (0.03)
f_i	1.362	2.158	2.93	1.25
K'_i $\mu g/g$	0.138	-	-	
K'_i μM	0.85			
K_i $\mu g/g$	-	-	0.026	-
K_i μM			0.16	

$K'_i/K_i = 5.38$

Table 31 - Kinetic parameters of the Honeybees -α - glucosidase inhibition by BAY n 5595

	V_M $\mu M.\ min.^{-1}\ \mu l^{-1}$	K_m mM	V_M/K_m
Controls (N = 7)	12.54 (1.61)	5.40 (0.82)	2.32
Inhibition (N = 6) I = 15 μM	11.81 (1.23)	10.33 (1.19)	1.14
f_i	0.94	1.91	2.03
K'_i	∞	-	-
K_i $\mu g/g$	-	-	0.485
K_i μM	-	-	14.87

Les résultats (en cours de publication dans Biochemical Pharmacology) appellent plusieurs remarques importantes :

1° - L'efficacité relative des 3 composés s'exprime dans l'ordre suivant, en fonction des valeurs de I50 exprimées soit en µM, soit en µg/200 µl :

Composés	niveaux d' efficacité avec I50 en µM	niveaux d' efficacité avec I50 en µg/200 µl
BAY e 4609	1	1
BAY n 5595	7	163
BAY g 5421	447	1 943

Cette classification s'ordonne de la même manière que chez les Vertébrés, et d'une manière quantitativement comparable (PULS et al., 1980, Frontiers of Hormone Research, 236-247). Dans le cas de BAYg 5421, les valeurs de Ki sont respectivement de 0,26 µM chez le Rat (Schmidt et al., op.cit., 1977) et 0,17 µM chez l'Abeille.

La première conclusion est que l'enzyme de l'Abeille constitue un matériau significatif pour éprouver l'activité des inhibiteurs.

2° - Alors que chez les Vertébrés les mécanismes cinétiques n'ont été que sommairement étudiés (l'Acarbose est simplement considéré comme agissant par compétition : Schmidt et al., 1977), l'analyse des mécanismes a pu être approfondie dans le cas des α-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles.

Les inhibiteurs BAYe 4609 et BAYg 5421 appartiennent à la même famille chimique : leurs mécanismes d'action présentent un point commun important : la fixation allostérique de l'inhibiteur et du substrat sur l'enzyme ($n \simeq 1,23$).

Ils divergent, par contre, sur d'autres aspects de leur mode d'action :

- BAYe 4609 donne lieu à un mécanisme NON COMPETITIF ALLOSTERIQUE, soit de TYPE (V) PUR.
- BAYg 5421 est un inhibiteur allostérique mixte dans lequel la contribution compétitive est dominante.
- L'inhibiteur BAYn 5595 est, quant à lui, un INHIBITEUR COMPETITIF MICHAELIEN PUR.

La comparaison des mécanismes d'action de ces trois classes d'inhibiteurs, avec ceux du tréhalose et du saccharose sur les pNP- α -glucosidases de l'Abeille, a permis de comprendre le rôle des diverses parties des molécules, et de suggérer la structure de principe d'autres inhibiteurs hypothétiques (fig. 29).

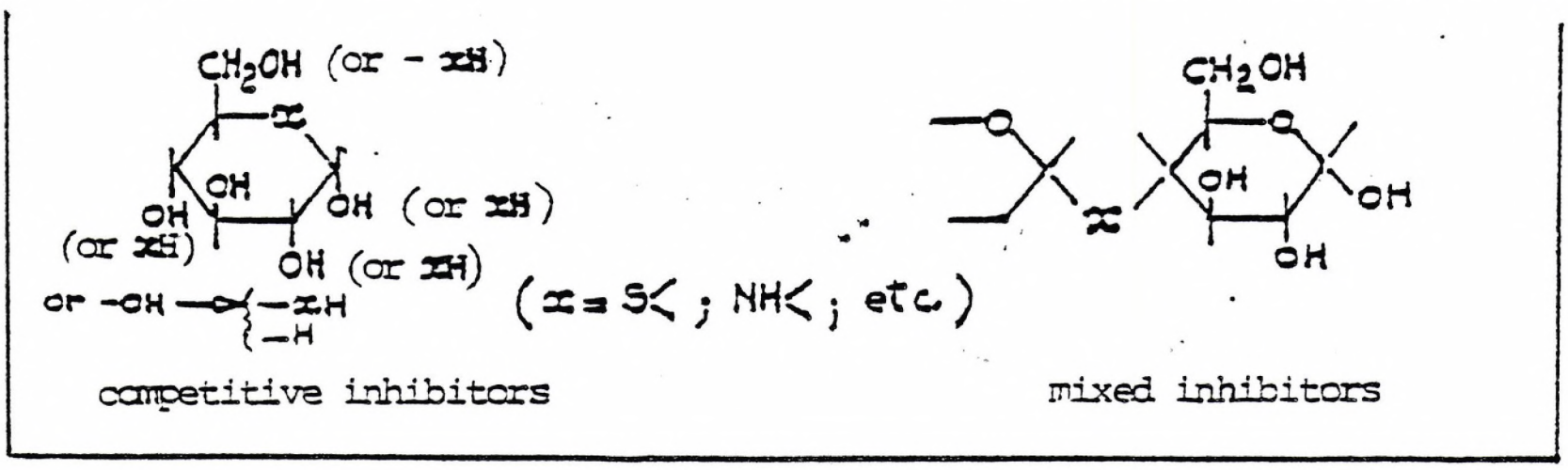


fig. 29 - Formules de principe de nouveaux inhibiteurs suggérés par les relations structure/activité précédemment établies.

La puissance de ces inhibiteurs (plus de 1000 fois celle du glucose lui-même) donne à penser que leur action pourrait être utilisée dans certains cas particuliers de lutte contre des Insectes au métabolisme énergétique à dominante glucidique (blocage du tréhalose, et insuffisance glycémique) : mais dans ce cas, il conviendrait de ne pas oublier les risques encourus par les Abeilles et selon toute vraisemblance, par les autres Hyménoptères auxiliaires de l'Agriculture.

Sur le plan purement fondamental, il est très important de noter que nous avons obtenu pour la première fois une inhibition allostérique à partir d'un extrait enzymatique présentant, au départ, une cinétique du type à coopérativité négative (fig.30), ce qui vient confirmer toutes les hypothèses antérieures sur le caractère d'universalité du mécanisme de régulation des α-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles.

C.R.Ann. Trav. Lab. BC, 10, Chap. VIII

VIII - BIOCHIMIE APPLIQUEE A LA PHYTOPROTECTION

Coll. avec le C.U. d'AVIGNON (Faculté des Sciences)
Prof. Ph. J. COULOMB

A la suite d'une collaboration entreprise depuis la fin de 1980 avec le Professeur COULOMB Spécialiste de Biologie cellulaire, Directeur du Service de Physio-pathologie Végétale (actuellement : 3ème cycle "Phytoprotection") sur le thème général : "mécanismes biochimiques des phénomènes de toxicité et de résistance dans le domaine de la Phytoprotection", il a été convenu, à partir de cette année, d'établir entre les deux Services, une coopération scientifique permanente, compte tenu de la complémentarité de nos objectifs (Phytopharmacie) et de nos disciplines (biologie-physiologie/biochimie).

Une série de travaux a d'ores et déjà porté sur la comparaison des spectres quantitatifs respectifs des glucides et des protéines chez des Végétaux sensibles ou résistants à des agents pathogènes, en fonction de l'état induit (ou non) à "résistance", ainsi que chez le pathogène lui-même. Les premières recherches ont porté sur le "couple" Capsicum annuum / Phytophthora capsici, ainsi que sur certaines variétés de Triticum. Un programme à moyen et long terme coordonné avec les futurs objectifs INRA/Phytopharmacie est en cours d'élaboration. Cette coopération permanente, à laquelle il faut ajouter l'appui du Service de Chimie Bio-Organique dirigé par le Professeur PAVIA, devrait pouvoir se traduire dans un proche avenir, par la constitution d'un Institut de structure mixte (Université/INRA) dont le noyau de Recherche Fondamentale serait constitué des trois services : Chimie-Biologie-Biochimie travaillant en totale coordination sur des objectifs de Phytopharmacie jugés prioritaires à long terme.

CONCLUSION AU MEMOIRE SCIENTIFIQUE

L'ensemble des travaux de 1981 coïncide avec le transfert du LBC au Département de Phytopharmacie et à l'orientation des applications pratiques des recherches en cours vers la toxicologie de l'Abeille, en relation avec les traitements agrochimiques.

Le programme d'étude des Hormones est suffisamment avancé pour permettre l'interprétation d'effets pathologiques "cryptiques" tels que seules des épreuves fonctionnelles (hyper ou hypoglycémies provoquées) pourraient les mettre en évidence.

L'ensemble des données acquises depuis 8 ans sur la Biochimie de l'Abeille constitue un potentiel scientifique concret dont la mise en application dans l'optique "Phytopharmacie" s'effectuera de la manière la plus directe. Chaque étape supplémentaire franchie dans le domaine de la Connaissance pure fournira ensuite autant de jalons nouveaux dans les possibilités d'applications.

D'autre part, la remise à jour des capacités analytiques de Biochimie Végétale, (collaboration avec l'Université et le C.N.E.S.), fournit d'ores et déjà un appui logistique dans l'élaboration de programmes prenant en compte les effets non intentionnels des traitements agrochimiques sur les plantes cultivées elles-mêmes.

Les connaissances acquises au niveau des processus d'induction, en cours d'analyse en collaboration avec le Prof. MORGAN trouveront des applications au niveau des phénomènes de résistance, et les travaux de Biochimie thanatologique entrepris en relation avec la Fac. des Sc. Méd. et Vétér. de Belgrade, constituent le premier pas vers l'objectif de Sémiologie Biochimique dont le LBC entend faire l'un de ses "chevaux de Bataille".

D E U X I E M E P A R T I E

C O M P T E R E N D U A D M I N I S T R A T I F

C.R.Ann. Trav. Lab. BC, 10, 2ème partie

I - BILANS BUDGETAIRES

Les attributions initiales s'établissaient de la façon suivante :

I-1 FONCTIONNEMENT (SOUTIEN DE PROGRAMME)

- Budget primitif (reliquat 1980 compris) : 21 120,00 (TVA : 12%)

  Déduction pour fluides : -2% soit : - 422,40

  PRIMITIF DISPONIBLE : 20 697,60

- Contrat CNES : 5 000,00

  Prélèvement administratif : - 10% : - 500,00

  SOLDE DISPONIBLE : 4 500,00

BUDGET TOTAL PRIMITIF : 25 197,60

DEPENSES PAR CHAPITRES INTERNES

Référence	Objet	Montants facturés	Reliquat Engagements
634-4	Courrier	1 357,80	-
634-1-1	Matériel de Labo	7 070,96	-
634-1-2	Produits Chimiques	3 471,33	-
634-1-3	XEROX	1 084,00	300(*)
634-1-3	Papeterie	1 228,53	-
634-3	Documentation	10 360,76	260(**)
631-5	Entretien	490,00	-
		25 063,38	560,00
	SOLDE +	134,22 ----	-425,78

(*) Estimation Xerox Décembre 81 d'après Déc.80

(**) 1 poste de 510 F d'échéance indéterminée est reporté sur l'exercice 1982 (Facture tirés à part)

I-2 EQUIPEMENT

Attributions primitives :		Dépense :
ATP Méthodologie Biochimique en Agronomie :	50 000 F →	48 499,99
Reliquat Dépt. de Zoologie :	15 000 F →	14 549,88
Aide exeptionnelle Phytopharmacie : env.	15 000 F →	13 664,69
TOTAL :	TTC	76 714,56

Note : compte "Zoologie" : Solde = +450,12

Bilan de Mise à jour / Dépt. Zoologie :

solde + = 450,12
solde - = 425,78
Bilan = +024,34 F
soit 0,024% du B. Total

BUDGET TOTAL : 101 777,94 F

II - PREVISIONS 1982

Le LBC en tant qu'entité scientifique (donc également administrative en raison de la non-séparation des deux comptes à l'INRA) est rattaché au Département de Phytopharmacie et d'écotoxicologie à compter du 1er Janvier 1982 (confirmation à M. l'Administrateur du Centre par note Réf. 82-001).

Les prévisions budgétaires pour 1982 s'établissent comme suit, à la suite des indications précisées par le Chef de Département :

Fonctionnement : 60 000 F environ
Equipement : 110 000 F sous réserve des attributions à l'échelon supérieur
Aménagement des locaux : 80 000 F (sur 150 000 F prévus pour l'ensemble de:Biochimie+Pollution de l'Environnement)

PROJETS DE DISTRIBUTION DES DEPENSES

A - Sur ce budget, une somme de l'ordre de 25 000 F devra être consacrée à l'achat de mobilier (bureaux - armoires - bibliothèques) et à l'acquisition d'une machine à écrire à hautes performances, en raison de la charge importante de typographie et de dactylographie prévue dès 1982 (2 à 3 ouvrages et une dizaine de publications).

B - En fonctionnement, un effort important sera de nouveau tourné vers la documentation, avec l'acquisition prévue d'assez nombreux ouvrages.

La répartition primitive pourrait se présenter comme suit :

634-1-1 :	6 000	634-3 :	13 000	29 000 →	
634-1-2 :	4 000	634-4 :	1 500		
634-1-3 :	2 000	631-5 :	1 000		
6341-4 :	1 500				
Stages (indemnité courte durée)		2 000		31 000	
Aménagements/équipement mobilier		25 000		56 000	
M.O.O		4 000		60 000	

cumul:

C - En équipement : 2 solutions se présentent, selon les circonstances

a) attribution effective des 110 000 F : Micro polarimètre enregistreur(INSTRULAB)

b) attribution d'une somme inférieure :
prévisions à établir selon le montant disponible, soit en particulier :
-Bioluminomètre enregistreur "en continu" : 54 000 F HT
-Balance analytique automatique sensible au µg : 15 000 F
-Compléments de mobilier de Bureau
-Armoire à solvants (3 000 à 13 000 F selon les modèles)
-Un réfrigérateur et un congélateur non givrants (15 000 F)
-Un cryogène (8 000 F)

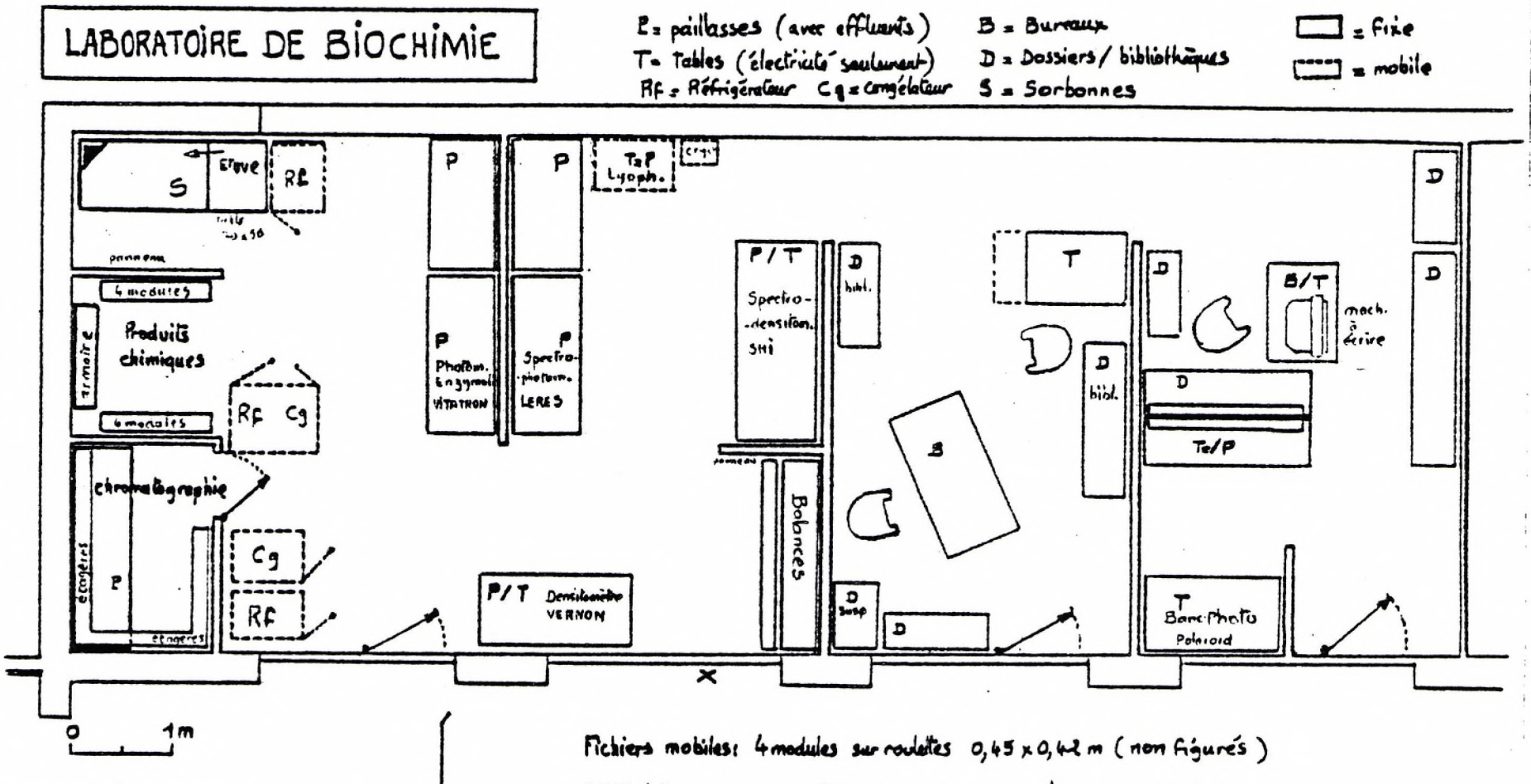
D - Aménagement des locaux

La figure 30 illustre l'aménagement de la surface la plus rapidement disponible. Celle-ci représente actuellement : 67,5 m2
-Surface de l'ancien Laboratoire : 65,8 m2 soit gain de 01,7 m2

Perspectives :

Deux pièces de 3,1 x 5 m seront occupées temporairement par M. André, Chef du Département de Technologie des Prod. Vég., et l'attribution d'une salle contigüe de 5 x 6,40 m est en cours de négociation : soit à terme, une prévision portant sur un supplément de 63 m2, ce qui amènerait la surface totale finale de Laboratoires et bureaux compris à 130 m2.

L'installation du LBC pourrait, dès lors, être considérée comme satisfaisante.



Fichiers mobiles: 4 modules sur roulettes 0,45 x 0,42 m (non figurés)

Bibliothèque : ≥ 6m lin. rayonnages en largeur ≃ 0,30m

Dossiers : ≃ 32m lin. rayonnages en largeur ≃ 0,40m / haut. ≃ 0,32m

Produits : 8 modules de 1,07 x 0,23 x 0,52m + 1 armoire inox verrouillable

Petit matériel, Verrerie etc. : ≃ 30m lin. en larg. 0,25m / haut. 0,50m

"Gros matériel" : ≥ 15m lin. en largeur 0,70m ± 0,05m

PROJET INITIAL DE TRANSPOSITION DES INSTALLATIONS PRÉ-EXISTANTES

Capacités de mise en place pour 1982

évacuation sorbonne -

Fig. 30. Plan d'aménagement du LBC dans le Bâtiment "Phytopharmacie".

(1ère tranche de surface attribuée)

III - ATTRIBUTIONS DE PERSONNEL

- Le poste 5B reste à pourvoir (le formulaire d'autorisation de recrutement n'est pas encore revenu au Laboratoire à cette date).

- L'attribution d'un poste 2B a été décidée depuis Décembre 1980. Devant les difficultés de transformation du poste 5B en un poste de niveau supérieur, un recrutement d'attente a été envisagé sur le niveau actuel, avec re-embauche définitive sur 2B (en 1983 et recrutement complémentaire sur le 5B).
Candidature retenue sur 2B : Mlle VIALA* (DEUG)
Mission : Secrétariat Scientifique (collaboration technique, gestion et documentation).

Problème : forme d'embauche pour la période de transition?
(la période de formation nécéssaire est de l'ordre de 1 an au minimum : il est donc nécéssaire de recruter au plus tôt la personne qui occupera le poste en 1983, sous quelque forme "administrative" que ce soit...)

- Bourse thèse
L'UNAF propose une bourse de 3ème cycle pour 1983 sur le thème : transfert de substances d'activité médicinale entre la plante (fleur, nectar, pollen) et le miel via l'Abeille.

* Que nous tenons à remercier pour son aide dans la préparation de ce Mémoire _

De nombreuses candidatures sont encore arrivées cette année, de France et de l'Etranger, pour :

- Un emploi de Scientifique, d'Ingénieur ou de "Thésard".

- Un stage de Recherche (Sabbatique ou Doctoral).

Parmi les candidats Français : (pas de suite possible pour l'instant)

M. PEYRON J.M. - Maîtrise de Biochimie 1980

Mme VIGOUROUX-COEROLI C. - id.+DEA+thèse 3ème cycle biochimie 1977

M. ULLMANN G. - DEA biochimie 1981

Mlle THOMASSIN H. - Ingénieur Biochimiste INSA-LYON 1981

Mme OLLIER A. - DEA Biochimie 1976

etc...

L'attribution d'un poste d'Ingénieur de Recherche 3A a bien été prévu pour 1983 : il reste à espérer que le passage à la réalité ne soulèvera pas autant de difficultés que celui du poste 2B.

Parmi les candidats stagiaires étrangers à retenir :

Prof. MORGAN (Univ. Lancaster) : 2ème période Sabbatique (date à définir)

Mlle VAN DIJK (Wageningen, Holl.) : thèse Doctorat : accueil Sept.1982

1 chercheur Yougoslave (sélection en cours)

T R O I S I E M E P A R T I E

B I B L I O G R A P H I E 1 9 8 1

BOUNIAS, M., 1981 - A comparison of Haemolymph levels and interrelations of trehalose, glucose and fructose in workerbees from different races and hybrids. Comp. Biochem. 69B, 471-477.

BOUNIAS, M., 1981 - Blood sugar levels in worker Honeybees of different races as an index of their honey production. J. Apic. Res., 20 (4), 1-6.

BOUNIAS, M., ET KRUK, I, 1981 - Altération de l'action hyperglycémique de l'adrénaline chez l'Abeille par autoxydation partielle en adrénochrome avant l'injection. C.R.Soc.Biol., 175 (1),37-45.

KRUK, I, et BOUNIAS, M., 1981 - The participation of hydroxyl radicals in the reaction of the oxidation of the natural catecholamines. Postepy Fizyki Medycznej, nº 4, sous presse (en Polonais).

BOUNIAS, M., et MORGAN, M.R.J., 1981 - Mécanisme d'action du tréhalose comme inhibiteur mixte de l'activité pNP-α-D glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles. C.R.Soc.Biol., 175, 46-54.

———, ———, 1981 - Atténuation de l'inhibition mixte (V+K) de l'activité pNP-α-D glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles par le tréhalose in-vitro au moyen d'un mécanisme compensateur de type "n". C.R.Acad.Sc., 292, III, 883-886.

———, ———, 1981 - An in-vitro kinetic study of the mixed inhibition of honey bee haemolymph pNP-α-D glucosidase by sucrose. Experientia, 37, 1147-1148.

BOUNIAS, M., et MORGAN, M.R.J., 1981 - Non competitive inhibition of the Honey bee pNP-α-D glucosidase by chloramphenicol : a study in vitro. Arch.Internat.Physiol.Bioch., 89, 1-6 (sous presse).

BOUNIAS, M., 1981 - Micro-analyse quantitative par C.C.M. de quelques métabolites de l'hémolymphe d'Insectes. III Les Lipides. Analusis, 9, sous presse.

BOUNIAS, M., et MORGAN, M.R.J., 1981 - Action du chloramphénicol sur l'évolution du spectre protéique de l'hémolymphe d'Abeilles nourries de sirops de saccharose et de tréhalose. Apidologie, 13 (n°2), sous presse.

BOUNIAS, M., et MORGAN, M.R.J., 1981 - Adaptation de l'activité des tréhalases de l'hémolymphe d'Abeilles aux variations de la tréhalosémie in vitro : un mécanisme apparent de type inductif. C.R.Acad.Sci., 292, III, 1199-1202.

BOUNIAS, M., 1981-82 - The Honey bee haemolymph α-glucosidases as a test-tool for new inhibitors-research in diabete therapy. I - Kinetic study of in vitro α-glucosidases inhibition by BAYe 4609, BAYg 5421 and BAYn 5595. Biochemical Pharmacology, (Acc.R. 22-12-81).

BOUNIAS, M., et DUBOIS, P., 1981-82 - Inhibition de l'action hypoglycémiante de l'insuline par la somatostatine chez l'Abeille in vivo. C.R.Acad.Sc.

Les publications du LBC continuent à susciter un large accueil à l'extérieur. Plus de 250 demandes de tirés à part ont été reçues au cours de l'année. Un nouveau bilan par Pays et par Discipline sera établi en 1982. Il est à noter que les frais d'achat de tirés à part constituent actuellement une part non négligeable du budget "documentation" avec près de 4 000 F (3 864 F) pour la seule année écoulée. Le roulement de courrier correspondant contribue à augmenter le volume des envois : 2,8 et 2,4 pièces par jour, pour les moyennes annuelles 1980 et 1981.

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

"À bon vin point d'enseigne", assure un Sage Proverbe : si la Science ne peut toutefois se suffire à elle-même, il demeure que "les grands diseurs ne sont pas les grands faiseurs", de sorte que le TRAVAIL et son ABOUTISSEMENT restent les meilleurs -sinon les seuls- plaideurs de leur propre cause.

Le LABORATOIRE DE BIOCHIMIE a continué à "produire" à un rythme indéfectible, en dépit de la conjugaison des événements les plus désastreux qui pouvaient l'atteindre. "Il n'est que la Foi qui sauve"; or la Foi s'exprime ici dans l'Action!
LE LABORATOIRE DE BIOCHIMIE offre les services de son potentiel scientifique en apportant en garantie le bilan sans cesse croissant de ses publications : il propose de contribuer à la "Pharmacovigilance" au service de l'Agriculture (donc de l'Homme) et son passé scientifique l'autorise à envisager deux directions : la première reste axée sur la protection de l'Abeille (comme Modèle parmi les Hyménoptères, la plupart auxiliaires de l'Agriculture) et la seconde sur celle de Végétaux cultivés, dont les effets "non intentionnels" des traitements agrochimiques affectent le potentiel biotique, donc les rendements agricoles...

Les objectifs sont ambitieux mais "intellectuellement" réalisables au prix de la poursuite d'un travail intense et soutenu qui les rend matériellement accessibles, même si les moyens en équipement sont encore modestes.

Mais il serait déraisonnable de vouloir tirer encore longtemps profit des manifestations d'un"fantôme"... "On reconnait l'Arbre à ses Fruits", or les "fruits" présentés dans ce mémoire ne proviennent que d'un seul Arbre...

AVIGNON BIOCHIMIE
21-291

Veillons donc à lui garder quelques racines et quelques feuilles pour la prochaine cueillette!

Achevé le 21-1-82

Michel BOUNIAS
Docteur ès Sciences